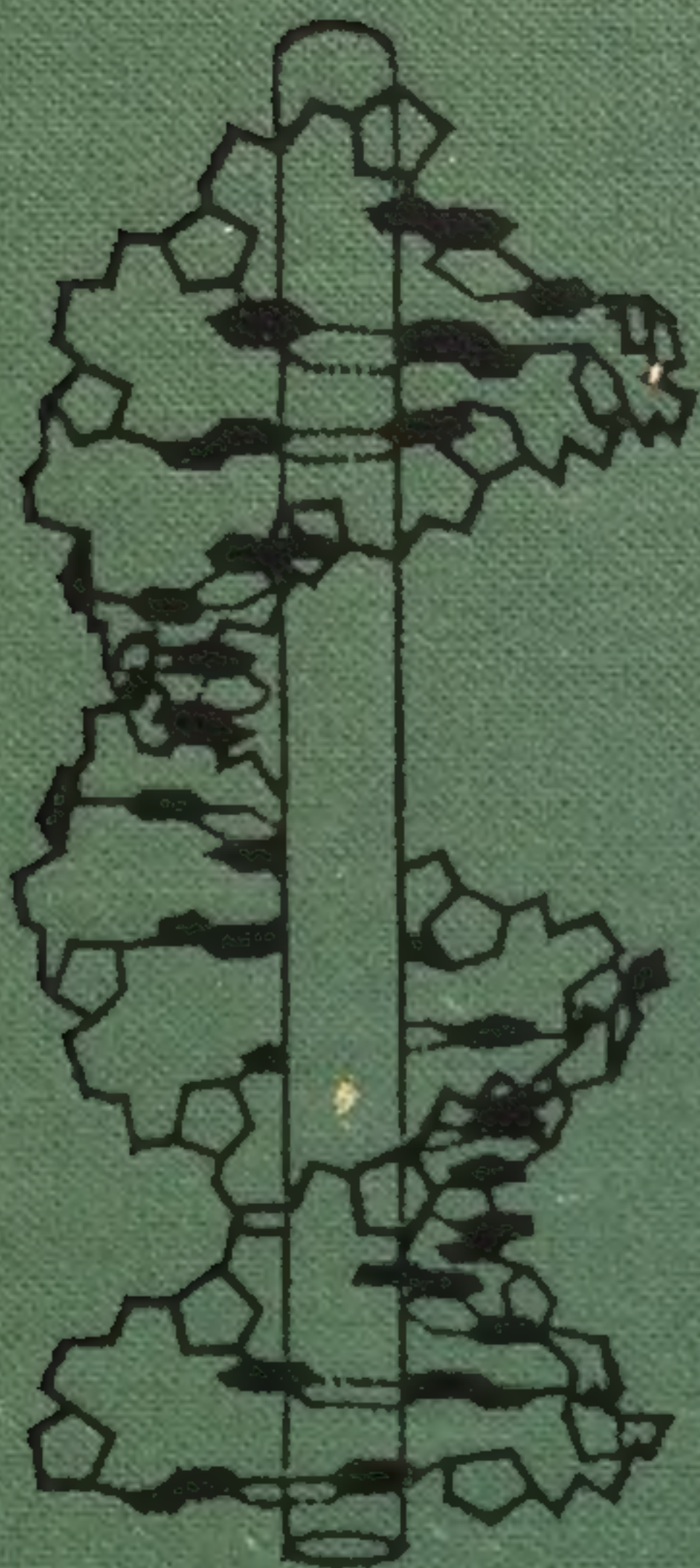
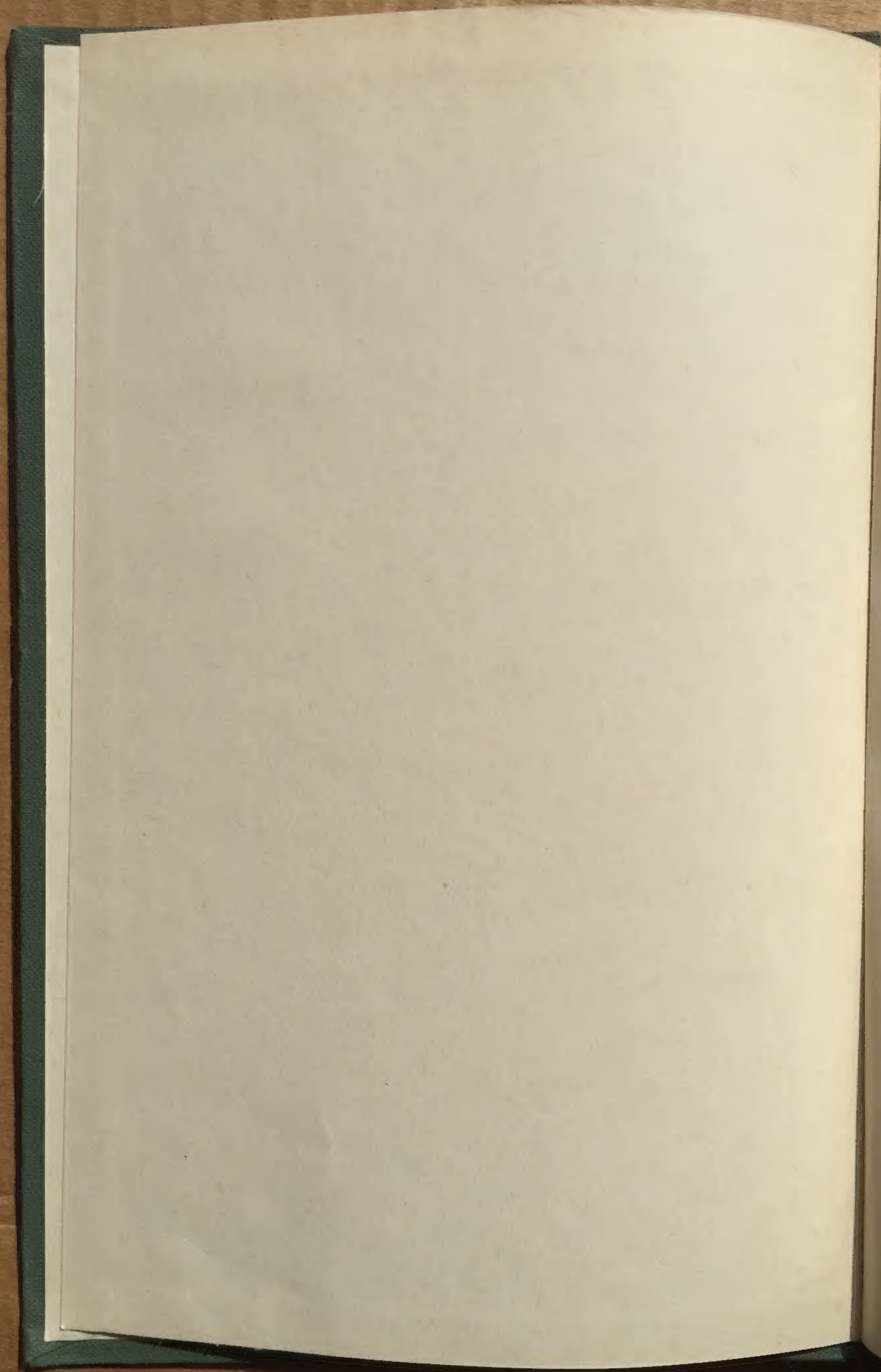


ДЖ. ДЭВИДСОН

БИОХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ







ИЗДАТЕЛЬСТВО

«МИР»

THE BIOCHEMISTRY
OF THE NUCLEIC ACIDS

J. N. DAVIDSON
D. Sc., M.D., F.R.S.

Gardiner Professor
of Biochemistry
in the University of Glasgow

FIFTH EDITION
1965

LONDON: METHUEN & CO LTD
NEW YORK: JOHN WILEY & SONS, INC

ДЖ. ДЭВИДСОН

БИОХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Перевод с английского
Н. В. Обручевой и М. Б. Штернберг

Под редакцией и с предисловием
акад. А. Н. Белозерского

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» МОСКВА 1968

Небольшая монография Дэвидсона выдержала в Англии за 15 лет 5 изданий (русский перевод 1-го издания был выпущен Издательством иностранной литературы в 1952 г.). Последнее, 5-е издание представляет собой в сущности совершенно новую книгу, в которой, несмотря на небольшой объем, автору удалось в доступной форме обобщить все, что нам известно о нуклеиновых кислотах. Отдельные главы посвящены истории открытия нуклеиновых кислот, строению их молекул, различным методам их исследования и определения, синтезу нуклеиновых кислот и их компонентов, ферментативному распаду, а также современным представлениям о биологической роли РНК и ДНК и т. д.

Предназначена для биохимиков, биофизиков, физиологов, микробиологов, генетиков, химиков и для специалистов других смежных областей, интересующихся современными проблемами биохимии. Может служить хорошим пособием для студентов и преподавателей.

Редакция биологической литературы

О Г Л А В Л Е Н И Е

Предисловие к русскому изданию	5
Предисловие к английскому изданию	6
Из предисловия автора	7
Принятые сокращения	9
Глава I. Введение	11
Литература	14
Глава II. Продукты гидролиза нуклеиновых кислот	16
Литература	26
Глава III. Хроматография и поглощение ультрафиолетовых лучей	29
Литература	36
Глава IV. Выделение, строение и свойства РНК	39
Литература	60
Глава V. Получение, строение и свойства ДНК	63
Литература	81
Глава VI. Нуклеазы и родственные им ферменты	84
Литература	97
Глава VII. Химические методы определения нуклеиновых кислот	99
Литература	114
Глава VIII. Гистохимия и цитохимия	117
Литература	144
Глава IX. Нуклеиновые кислоты вирусов	151
Литература	162
Глава X. Биосинтез моонуклеотидов	166
Литература	188
Глава XI. Репликация и биосинтез ДНК	194
Литература	223
Глава XII. Биосинтез РНК	229
Литература	257
Глава XIII. Биологическая функция РНК	292
Литература	292
Глава XIV. Биологическая функция ДНК	299
Литература	316
Глава XV. Катаболизм нуклеиновых кислот	321
Литература	326
Предметный указатель	327

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Предлагаемая читателю книга Дж. Дэвидсона «Биохимия нуклеиновых кислот» представляет собой перевод пятого английского издания, вышедшего в 1965 г. Русский перевод первого издания этой книги вышел у нас в 1952 г. Новое издание значительно шире по содержанию и больше по объему. Это вполне понятно, так как за последние 15 лет изучение нуклеиновых кислот развивается особенно интенсивно и продуктивно.

Поскольку книга Дэвидсона вышла в свет в 1965 г., неудивительно, что в ней не отражены в полной мере некоторые существенные достижения в области нуклеиновых кислот, которыми были ознаменованы последние $1\frac{1}{2}$ —2 года. В частности, за это время была полностью расшифрована первичная структура пяти растворимых РНК, причем первичная структура одной из них, а именно валиновой РНК, была полностью выяснена у нас А. А. Баевым с сотрудниками. За это же время Крик в ряде статей опубликовал данные о том, что по крайней мере 62 из 64 кодонов кодируют хотя бы одну из 20 обычных аминокислот, входящих в состав белков. Кроме того, им выдвинута новая гипотеза о механизме взаимодействия s-РНК, несущих соответствующие аминокислоты, с кодонами информационной или матричной РНК (так называемая «уобл-гипотеза»).

Невзирая на эти вполне естественные и независимые от автора упущения, книга Дэвидсона будет весьма полезной для всех тех, кто хочет поближе познакомиться с последними данными по химии нуклеиновых кислот, их структуре, биосинтезу и обмену, а также получить современные представления о процессе биосинтеза белка. Другими словами, эта книга-учебник может быть рекомендована широкому кругу биологов, химиков и физиков, интересующихся проблемой хранения наследственной информации и ее реализации в процессах развития и жизнедеятельности организма.

А. Н. Белозерский

ПРЕДИСЛОВИЕ К АНГЛИЙСКОМУ ИЗДАНИЮ

Серия «Биохимические монографии», выпускаемая издательством Метуен, по форме и задачам подобна сериям монографий по другим разделам науки. Отдельные книги этой серии можно рассматривать как части большого труда, отражающего достижения биохимии в целом. В задачу каждого тома входит всестороннее освещение современного состояния данного направления биохимических исследований. Книги написаны авторитетными специалистами соответствующей области как пособие для студентов последних курсов и для научных работников, желающих познакомиться с состоянием науки в области, близкой направлению их собственных исследований. Хотя эти книги предназначены для желающих изучать биохимию, на деле они привлекают внимание значительно более широкого круга читателей.

Книги удобны для пользования; по объему они больше, чем обзоры, но меньше, чем детальные монографии. Авторы не стремятся охватить всю имеющуюся литературу; однако они дают библиографические ссылки, которые должны помочь разыскать наиболее ценные работы по данному вопросу.

По мере развития биохимии эта серия будет охватывать все большее число разнообразных направлений — от таких, где преобладает химический аспект, до преимущественно биологических.

В книге проф. Дж. Дэвидсона обширная проблема биохимии нуклеиновых кислот рассматривается вся в целом, почти во всех ее разнообразных аспектах. В пределах сравнительно небольшого объема книги кратко рассмотрены химия нуклеиновых кислот, методы их определения, локализация и роль в клетке, обмен (включая биосинтез), а также их биологическое значение и связь с вирусами. Книга была переведена на русский, французский, польский и японский языки. Ее популярность растет с выходом каждого очередного издания, создаваемого плодотворным пером автора. Эта книга была первой в серии «Биохимические монографии», однако ввиду частых публикаций новых ее изданий она никогда не отставала от современного состояния проблемы. Излишне говорить о большом спросе на эту книгу. Достаточно указать, что за 15 лет она выдержала 5 изданий; *res ipsa loquitur*.

ИЗ ПРЕДИСЛОВИЯ АВТОРА

Первое издание этой маленькой книжки, фамильярно именуемое сотрудниками нашей лаборатории в Глазго «Детский справочник по нуклеиновым кислотам», появилось в 1950 г. Всего лишь за 15 лет книга выдержала пять изданий. Это свидетельствует о быстром развитии исследований в этой области и о большом интересе к нуклеиновым кислотам, проявляемом в течение последних лет как химиками, так и биологами. Первое издание книги было переведено на русский язык, третье — на французский и японский, а четвертое — на польский.

Бурное развитие наших знаний, происшедшее за последние годы в области изучения нуклеиновых кислот, особенно в связи с проблемой процессов биосинтеза и кодирования, а также в связи с развитием представления о РНК-посреднике, привело к необходимости полностью переработать почти половину книги; оставшая часть подверглась существенной обработке, а устаревший материал и вовсе был исключен. Таким образом, настоящее, пятое, издание сильно отличается от четвертого и имеет весьма мало общего с первым изданием. Однако заглавие сохранилось без изменения. В последнее время стало модным употреблять термин «молекулярная биология» для обозначения биохимического направления в изучении таких макромолекул, как нуклеиновые кислоты и белки. Однако мы оставили в заглавии термин «биохимия», который и означает «изучение на молекулярном и атомном уровнях организации и функции биологических систем».

В течение последних 3—4 лет был опубликован также ряд выдающихся монографий, обзоров и трудов конференций, посвященных нуклеиновым кислотам. На страницах этой книги даны многочисленные ссылки на подобного рода работы. Одна из наиболее важных задач, которую мы при этом преследовали, состоит в ознакомлении читателя с работами, в которых он найдет более детальное освещение определенных вопросов, рассмотренных здесь недостаточно подробно.

Мы пытались отразить в книге всю литературу, опубликованную до января 1965 г. Однако изучение нуклеиновых кислот развивается так быстро, что часть представленного в книге материала

оказалась перекрытой новейшими данными еще до выхода ее в свет. Недостаток этот неизбежен, и извинения излишни. Более серьезно то, что ввиду небольшого объема книги автор не мог отдать должное работе всех исследователей, опубликовавших ценные и даже фундаментальные труды в области изучения нуклеиновых кислот. В связи с этим каждая глава снабжена небольшим, но тщательно отобранным перечнем обзоров и важнейших оригинальных работ.

Следует еще раз подчеркнуть, что настоящая книга — отнюдь не монография, дающая исчерпывающее изложение биохимии нуклеиновых кислот. Автор ставил себе задачу дать элементарный очерк главнейших свойств нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов для изучающих биохимию, а также для химиков, желающих ознакомиться с биологическим аспектом проблемы, и биологов, стремящихся узнать кое-что о химической стороне вопроса.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	— рибонуклеиновая кислота
s-РНК	— растворимая РНК (транспортная, адапторная, акцепторная РНК, РНК-переносчик)
m-РНК	— информационная РНК (РНК-посредник, матричная РНК)
r-РНК	— рибосомная РНК
n-РНК	— ядерная РНК
ДНК-аза	— дезоксирибонуклеаза
РНК-аза	— рибонуклеаза
АМФ	— аденозин-5'-монофосфат
АДФ	— аденозин-5'-дифосфат
АТФ	— аденозин-5'-трифосфат
ГМФ	— гуанозин-5'-монофосфат
ГДФ	— гуанозин-5'-дифосфат
ГТФ	— гаунозин-5'-трифосфат
ЦМФ	— цитидин-5'-монофосфат
ЦДФ	— цитидин-5'-дифосфат
ЦТФ	— цитидин-5'-трифосфат
УМФ	— уридин-5'-монофосфат
УДФ	— уридин-5'-дифосфат
УТФ	— уридин-5'-трифосфат
ОМФ	— оротидин-5'-монофосфат
ИМФ	— инозин-5'-монофосфат
2'-АМФ	— аденозин-2'-монофосфат
3'-АМФ	— аденозин-3'-монофосфат
5'-АМФ	— аденозин-5'-монофосфат
д-АМФ	— дезоксиаденозин-5'-монофосфат
д-АДФ	— дезоксиаденозин-5'-дифосфат
д-АТФ	— дезоксиаденозин-5'-трифосфат
д-УМФ	— дезоксиуридин-5'-монофосфат
д-ГМФ	— дезоксигуанозин-5'-монофосфат
д-ГДФ	— дезоксигуанозин-5'-дифосфат
д-ГТФ	— дезоксигуанозин-5'-трифосфат
д-ЦМФ	— дезоксицитидин-5'-монофосфат

д-ЦДФ	— дезоксицитидин-5'-дифосфат
д-ЦТФ	— дезоксицитидин-5'-трифосфат
д-ТМФ ¹	— дезокситимидин-5'-монофосфат
д-ТДФ ¹	— дезокситимидин-5'-дифосфат
д-ТТФ ¹	— дезокситимидин-5'-трифосфат
Т	— дезокситимидин
Ф	— неорганический ортофосфат
ФРПФ	— 5-фосфо- α -D-рибозилпирофосфат
Пур	— пурин
Пир	— пиримидин

Полимеры:

Поли-Х, поли-дХ	— линейный 3'—5'-полимер рибонуклеотида Х или дезоксирибонуклеотида дХ
Поли-(Х—У) или поли-р-(Х—У)	— линейный 3'—5'-сополимер Х—У—Х—У (чередование в известной последовательности)
Поли-д-(Х—У)	— линейный 3'—5'-сополимер дХ—дУ—дХ—дУ (чередование в известной последовательности)
Поли-(Х, У)	— линейный 3'—5'-сополимер Х и У в случайной последовательности
Поли-(А) : поли-(Б)	— две цепи; соединенные водородными связями почти по всей длине
Поли-(А), поли-(Б)	— две цепи; степень насыщенности водородными связями неспецифична или неизвестна.

Наименования ферментов соответствуют номенклатуре, принятой Комиссией по ферментам Международного союза биохимиков (1961). После названия каждого фермента указан индекс, принятый этой комиссией.

¹ Поскольку углеводный компонент тимидина всегда представлен дезоксирибозой, то приставку «дезокси» (д) иногда опускают.

ГЛАВА I

ВВЕДЕНИЕ

Существование нуклеиновых кислот было установлено в результате фундаментальных исследований Мишера [1] (1844—1895), которого можно считать основоположником изучения химии клеточного ядра. В одной из первых своих работ, проведенной в 1868 г. в лаборатории Гоппе-Зейлера в Тюбингене, Мишер изолировал ядра клеток гноя, взятого из использованного перевязочного материала. В ядрах Мишер обнаружил необычное фосфорное соединение, названное им *нуклеином*. Этот нуклеин является, как мы теперь знаем, нуклеопротеидом. Затем Мишер продолжал свои исследования в Базеле (где он провел большую часть своих исследований, используя в качестве источника ядерного материала сперму лосося). В 1872 г. он установил, что изолированные головки сперматозоидов содержат какое-то кислое соединение, известное в настоящее время как нуклеиновая кислота, и основание, названное *протамином*. В дальнейшем было установлено, что нуклеиновые кислоты входят в состав всех исследованных клеток и тканей. Работы Мишера по изучению нуклеиновых кислот были продолжены Альтманом, описавшим в 1889 г. метод получения свободных от белка нуклеиновых кислот из животных тканей и дрожжей. Позже исследования в этом направлении велись Косселем в Гейдельберге, Джонсом в Балтиморе, Левином в Нью-Йорке, Гамарстеном в Стокгольме, Гуландом в Поттингеме и многими другими учеными [17].

Одним из наиболее удобных источников получения нуклеиновой кислоты у животных оказалась зубная железа. Не удивительно поэтому, что большинство работ посвящено изучению нуклеиновой кислоты из этого органа. При гидролизе последняя дает пуриновые основания (аденин и гуанин), пиримидиновые основания (цитозин и тимин), сахар, оказавшийся D (—)-2-дезоксирибозой, и фосфорную кислоту. Гидролиз же нуклеиновой кислоты, полученной из дрожжей, приводит к появлению аденина, гуанина, цитозина и урацила, сахара — пентозы, идентифицированной впоследствии как D (—)-рибоза, — и фосфорной кислоты. Таким образом, это соединение отличается от нуклеиновой кислоты зубной железы тем, что оно содержит урацил вместо тимина

и рибозу вместо дезоксирибозы. Как показали дальнейшие исследования, нуклеиновые кислоты, выделенные из различных животных тканей, сходны с нуклеиновой кислотой зубной железы. Из растительных тканей единственным источником для получения достаточного количества нуклеиновой кислоты оказались зародыши пшеницы. Выделенная из них так называемая тритико-нуклеиновая кислота оказалась очень сходной с дрожжевой нуклеиновой кислотой. Создавалось впечатление, что дезокси-пентозонуклеиновая кислота типа нуклеиновой кислоты зубной железы присуща животным тканям, а пентозонуклеиновая кислота типа нуклеиновой кислоты дрожжей характерна для растительных тканей. Так, Джонс в 1920 г. категорически утверждал, что «можно считать прочно установленным наличие в природе только двух нуклеиновых кислот, одна из которых содержится в ядрах животных клеток, а другая — в ядрах растительных клеток» [16].

Однако вскоре это представление пришлось пересмотреть. Наличие различных производных пентозы в тканях животных было известно и раньше. Например, было установлено, что так называемый β -нуклеопротенд, выделенный впервые из поджелудочной железы млекопитающих О. Гамарстеном [2] в 1894 г., содержит пентозу. Из этого материала Джорису [3] удалось в конце концов выделить нуклеиновую кислоту пентозного типа и показать, что по ряду свойств она подобна нуклеиновой кислоте дрожжей. Содержание этого соединения в поджелудочной железе оказалось весьма велико — до 10% ее общего веса. Пентозонуклеиновая кислота была обнаружена Одениусом [4] и Менделем и Левином [5] и в молочной железе. Наличие производных пентозонуклеотидов было установлено в тканях зародыша цыпленка Кэлвери [6], в селезенке и печени Джонсом и Перкинсом [7], Томасом и Берарну [8], а также в яйцах морского ежа Бланшаром [9]. Все эти факты наводили на мысль о том, что пентозонуклеиновые кислоты относятся к числу нормальных компонентов как животных тканей, так и растительных клеток. Джонс и Перкинс [7] высказали предположение, что «в будущем различия между растительной и животной нуклеиновыми кислотами окажутся не столь разительными».

Однако существенные сдвиги в изучении биологии нуклеиновых кислот произошли лишь в 40-х годах. Использование новых методов цитохимии и фракционирования клеточного содержимого позволило установить, что ДНК и РНК являются нормальными компонентами всех клеток — как растительных, так и животных, причем ДНК локализована в ядре, а РНК встречается и в цитоплазме [10, 11, 12, 13, 14, 18]. Более того, подобного рода исследования показали, что в интерфазе и при митозе в ядре ДНК сосредоточена, по-видимому, в хромосомах. Последнее наблюдение

приобрело огромное значение, когда было обнаружено, что очищенная ДНК, полученная из одного штамма пневмококка, может перманентно изменять наследственные свойства другого штамма этого же организма (см. гл. XIV). Возникло предположение, что ДНК, а может быть и РНК, непосредственно участвует в процессах регуляции жизнедеятельности клетки. Эта идея послужила стимулом для широкого изучения химии и биологии нуклеиновых кислот. Успеху обоих направлений исследования способствовало внедрение ряда новых ценных методов. В первую очередь к этим методам следует отнести: 1) применение хроматографии и ионофореза для анализа нуклеиновых кислот (гл. III); 2) использование новых усовершенствованных методов определения нуклеиновых кислот (гл. VII); 3) разработку и улучшение методов фракционирования клеточного содержимого (гл. VIII) и цитохимической фотометрии (гл. III и VIII) и, наконец, 4) использование в аналитических исследованиях ферментов.

Прямым результатом применения всех этих методов было значительное обогащение наших сведений о нуклеиновых кислотах. Сейчас мы знаем кое-что о строении ДНК и РНК (гл. IV и V) и о сложных процессах их синтеза (гл. XI и XII) и распада (гл. XV), мы все больше узнаем о роли нуклеиновых кислот в жизни клетки (гл. XIII и XIV).

Поскольку дезоксипентозонуклеиновую кислоту обычно получают из зубной железы телят, ее иногда называют тимонуклеиновой кислотой. В настоящее время мы не знаем, тождественны ли дезоксипентозонуклеиновые кислоты, получаемые из различных тканей. Поэтому, рассматривая какие-либо свойства ДНК, следовало бы указывать источник ее получения. Кроме того, мы не можем утверждать, что в данном типе нуклеиновой кислоты, независимо от источника ее получения, сахар всегда представлен дезоксирибозой. Поэтому термин *дезоксипентоза* точнее, чем термин *дезоксирибоза*. Таким образом, следовало бы говорить о *дезоксирибозополинуклеотиде* зубной железы или о *дезоксипентозополинуклеотиде* печени. Ввиду громоздкости этих названий обычно принято пользоваться термином *дезоксирибонуклеиновая кислота*. Применение этого общего названия отнюдь не предвещает вопроса об идентичности соединений, получаемых из различных органов представителей разных видов. В настоящее время для обозначения дезоксирибонуклеиновой кислоты широко используется символ ДНК.

Аналогично этому для обозначения пентозонуклеиновой кислоты правильнее было бы пользоваться терминами *рибозополинуклеотид* дрожжей или *пентозополинуклеотид* селезенки. Сахар идентифицирован как D (—)-рибоза только в полинуклеотидах дрожжей, печени и ограниченного числа других источников. Названия

«рибонуклеиновая кислота» или «рибополинуклеотид» можно, следовательно, с полным основанием применять только к соединениям, полученным из указанных источников. Тем не менее для удобства и унификации терминологии обычно говорят о *рибонуклеиновой кислоте* (РНК), имея в виду пентозополинуклеотид из любого источника. Использование этого термина вполне приемлемо, если учитывать приведенные выше замечания и помнить, что это лишь общее название целой группы веществ, а не наименование какого-то отдельного соединения.

За последние годы был опубликован ряд книг и сводок, посвященных нуклеиновым кислотам. Они перечислены в прилагаемом ниже списке литературы [19—38].

ЛИТЕРАТУРА

1. Miescher F., Die histochemischen und physiologischen Arbeiten (Leipzig), 1897.
2. Hammarsten O., Hoppe-Seyler's Ztschr., 19, 19 (1894).
3. Jorpes E., Biochem. Ztschr., 151, 227 (1924); Acta Med. Scand., 68, 253, 503 (1928); Biochem. J., 28, 2102 (1934).
4. Odenius R., Jahresber. Fortschr. Thierchem., 30, 39 (1900).
5. Mandel J. A., Levene P. A., Hoppe-Seyler's Ztschr., 46, 155 (1905).
6. Calvery H. O., J. Biol. Chem., 77, 489, 497 (1928).
7. Jones W., Perkins M. E., J. Biol. Chem., 62, 290 (1924—1925).
8. Thomas P., Berariu C., C. R. Soc. Biol., 91, 1470 (1924).
9. Blanchard K. C., J. Biol. Chem., 108, 251 (1935).
10. Feulgen R., Rossenbeck H., Hoppe-Seyler's Ztschr., 135, 203 (1924).
11. Кизель А., Белозерский А. Н., Hoppe-Seyler's Ztschr., 229, 160 (1934).
12. Белозерский А. Н., Биохимия, 1, 253 (1936); ДАН СССР, 25, 751 (1939).
13. Behrens M., Hoppe-Seyler's Ztschr., 253, 185 (1938).
14. Davidson J. N., Waymouth C., Biochem. J., 38, 39 (1944).
15. Pollister A. W., Mirsky E., Nature, 152, 692 (1943); *ibid*, 153, 711 (1944).
16. Jones W., The Nucleic Acids (London, Longmans, Green and Co.) (1920).
17. Levene P. A., Bass L. W., Nucleic Acids (New York, Chemical Catalog Company) (1931).
18. Davidson J. N., Waymouth C., Nutrition Abs. and Review, 14, 1 (1944—1945).
19. Jordan D. O., Chemistry of the Nucleic Acids, London, Butterworth (1960).
20. Allen F. W., Ribonucleoproteins and Ribonucleic Acids, Elsevier, Amsterdam, (1962).
21. Potter V. R., Nucleic Acid Outlines, Minneapolis, Burgess Publishing Co (1960).
22. Peacocke A. R., Drysdale R. B., The Molecular Basis of Heredity, London, Butterworth (1965).
23. Synthesis and Structure of Macromolecules, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., Vol. 28 (1963).
24. Steiner R. F., Beers R. F., Polynucleotides, Elsevier, Amsterdam (1961).

25. P e r u t z M. F., Proteins and Nucleic Acids, Elsevier, Amsterdam (1962).
26. The Structure of Nucleic Acids and their Role in Protein Synthesis, Biochemical Society Symposium, No. 14 (1957).
27. Acides Ribonucleiques et Polyphosphates, CNRS, Paris (1962).
28. Deoxyribonucleic Acid: Structure, Synthesis and Function, Proceedings of the 11th Annual Reunion of the Société de Chimie Physique, London, Pergamon (1962).
29. C h a r g a f f E., Essay on Nucleic Acids, Elsevier, Amsterdam (1963).
30. S t e i n e r R. F., The Chemical Foundations of Molecular Biology, Princeton, Van Nostrand (1965).
31. W a t s o n J. D., Molecular Biology of the Gene, New York, Benjamin, 1965. (Уотсон Дж., Молекулярная биология гена, М., «Мир», 1967.)
32. C h a r g a f f E., D a v i d s o n J. N. (Eds.), The Nucleic Acids, Vols. 1 and 2 (1955); Vol. 3, New York, Academic Press (1960). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1957, и Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1962.)
33. D a v i d s o n J. N., C o h n W. E. (Eds.), Progress in Nucleic Acid Research, Vols. 1 and 2 (1963); Vol. 3, New York, Academic Press (1964).
34. M i c h e l s o n A. M., The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, New York, Academic Press (1963).
35. T a y l o r J. H. (Ed.), Molecular Genetics, Part. I, New York, Academic Press (1963). (Молекулярная генетика, М., «Мир», 1965, стр. 229.)
36. V o g e l H. J., B r y s o n V., L a m p e n J. O. (Eds.), Informational Macromolecules, New York, Academic Press (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 229.)
37. S c h m i d t G., Ann. Rev. Biochem., 33, 667 (1964).
38. H a r b e r s E., Die Nucleinsäuren, Stuttgart, Thieme (1964).

ГЛАВА II

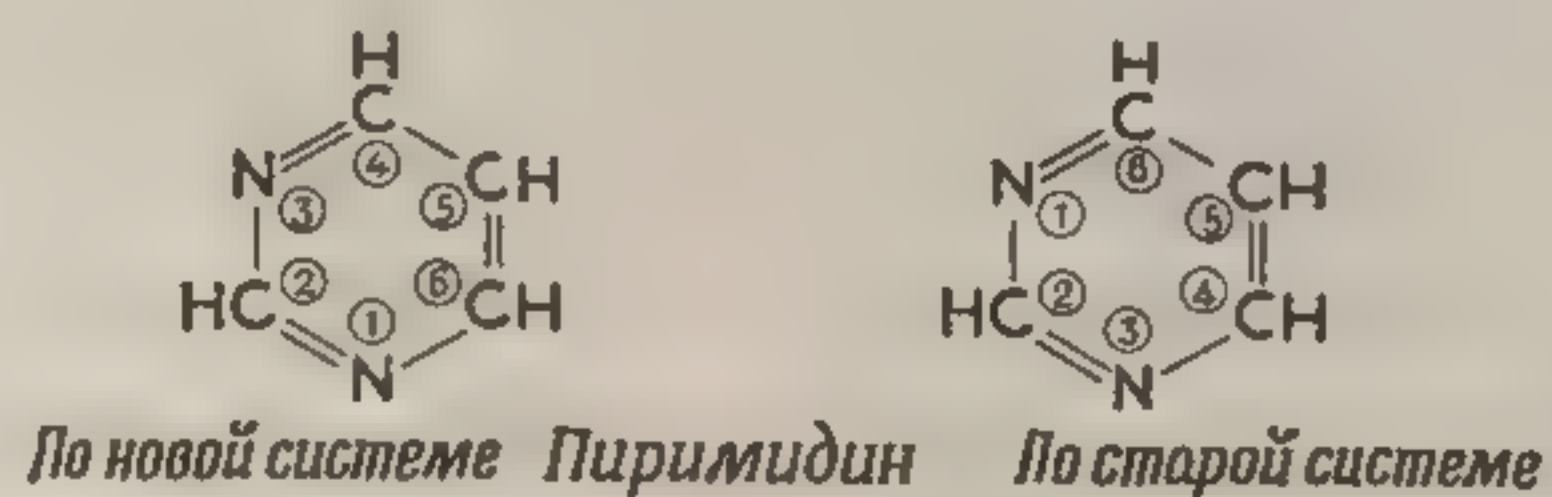
ПРОДУКТЫ ГИДРОЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Введение

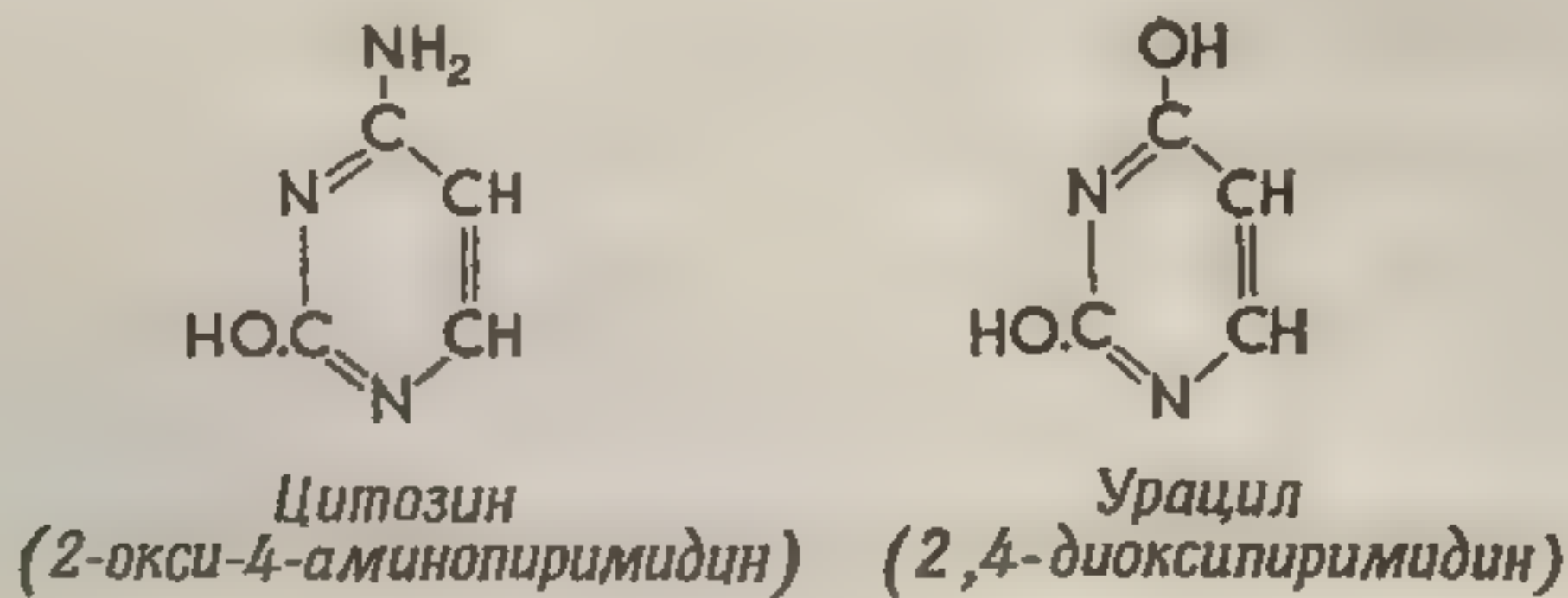
Прежде чем перейти к изложению вопроса о структуре нуклеиновых кислот, следует рассмотреть строение отдельных соединений, входящих в состав молекулы нуклеиновой кислоты. В результате полного гидролиза нуклеиновых кислот образуются пириимидиновые и пуриновые основания, сахар и фосфорная кислота. Частичный гидролиз приводит к образованию нуклеозидов и нуклеотидов. Все эти соединения рассмотрены ниже.

Пириимидиновые основания

Все пириимидиновые основания являются производными пириимидина.



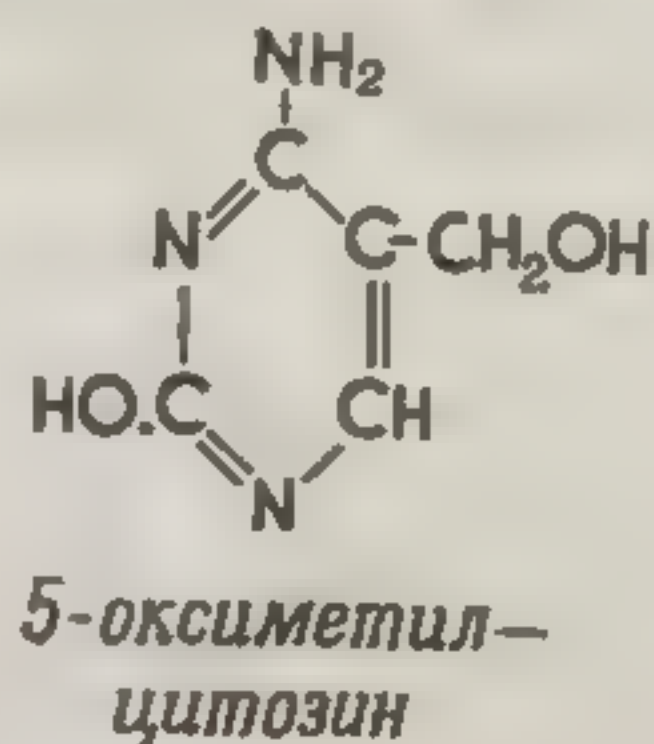
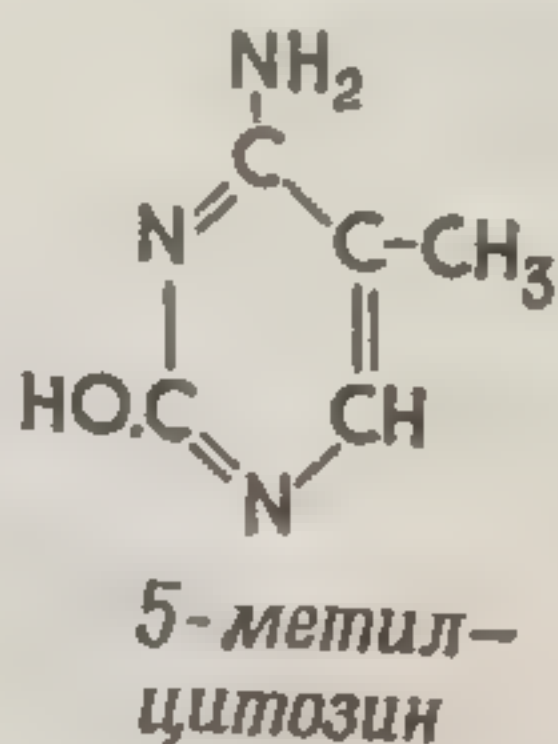
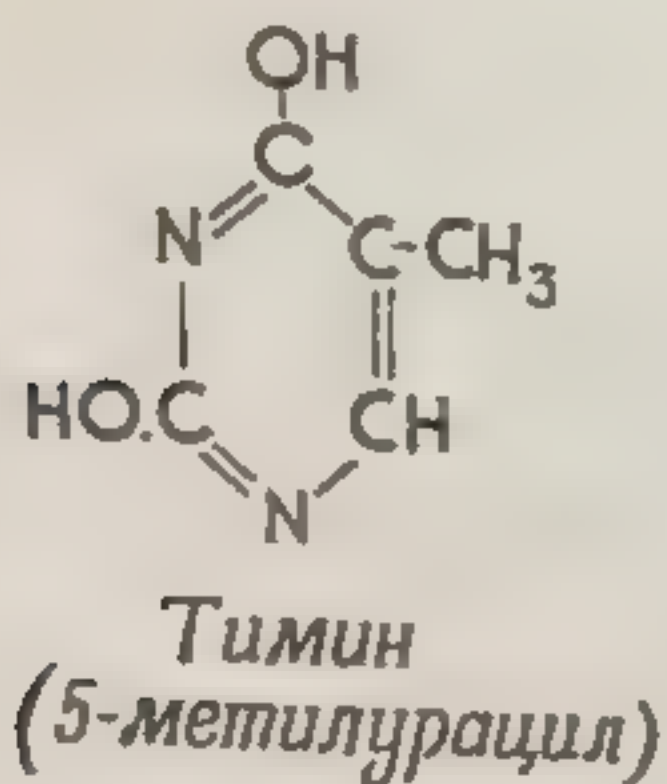
Из пириимидиновых оснований в составе нуклеиновых кислот обнаружены цитозин, урацил, тимин и 5-метилцитозин, причем цитозин содержится в нуклеиновых кислотах обоих типов, урацил входит в состав РНК, а тимин и 5-метилцитозин обнаружены в ДНК. Пятый пириимидин, 5-оксиметилцитозин, замещает цитозин у некоторых штаммов фага кишечной палочки (см. стр. 157).



Пр
иметь
характ
зуются
(стр. 16
меняет
новая
в США

Нуд
пурино
ставля
из пир

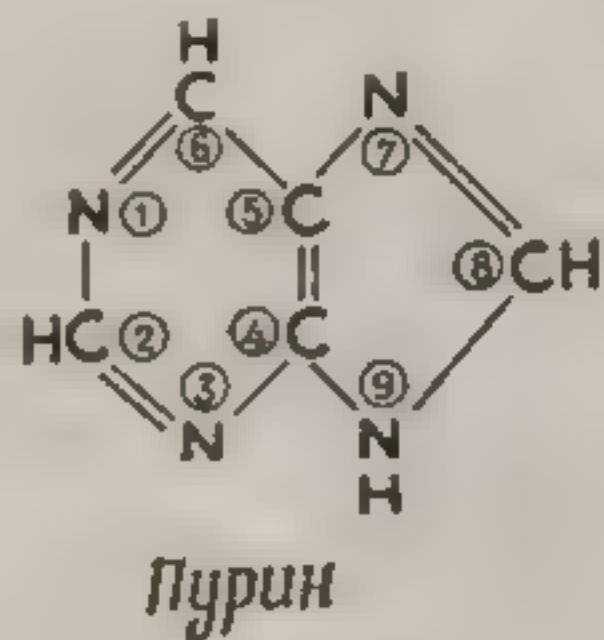
Аде



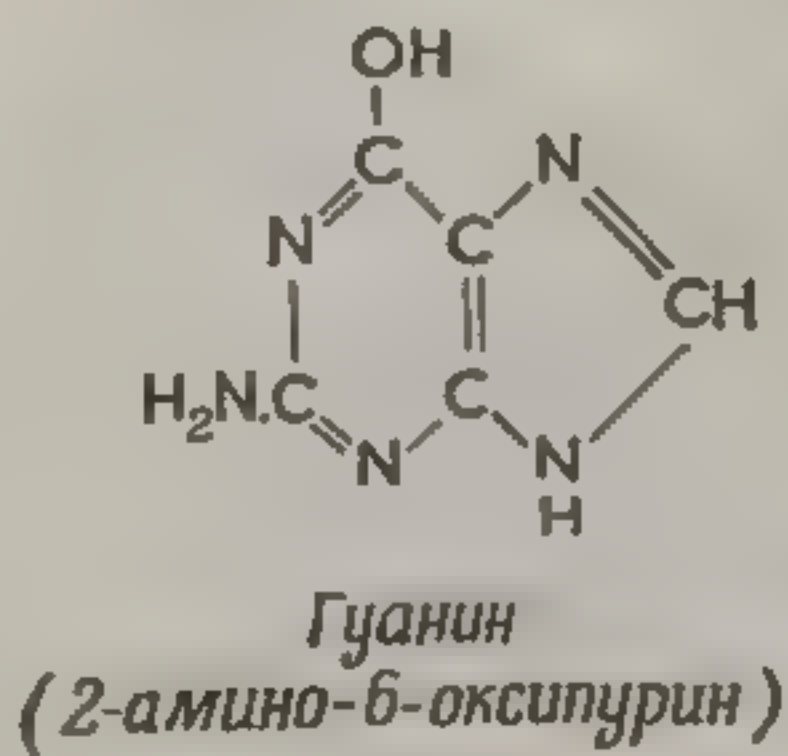
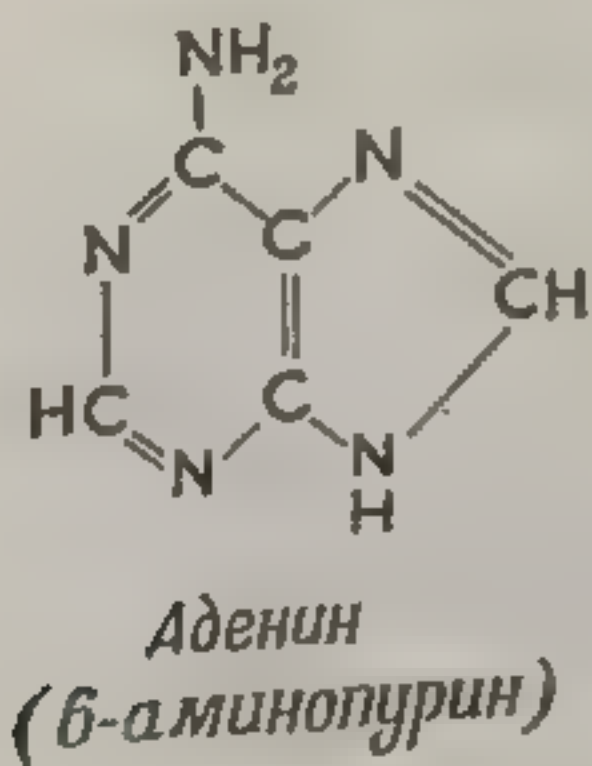
Приведенные выше формулы общеприняты, однако следует иметь в виду, что для пуриновых и пиримидиновых производных характерна кето-енольная изомерия. В настоящее время используются две системы нумерации членов пиримидинового кольца (стр. 16), что часто приводит к путанице. В Европе широко применяется старая система нумерации, указанная на стр. 16 справа; новая же система, приведенная слева, завоевала признание в США. В этой книге мы придерживаемся последней системы.

Пуриновые основания

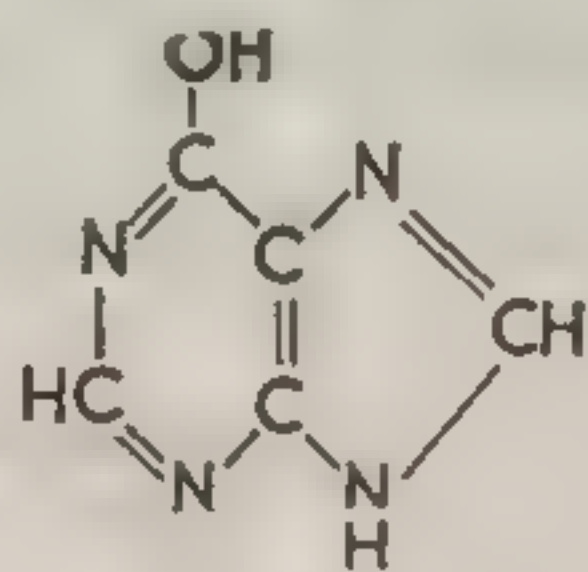
Нуклеиновые кислоты обоих типов содержат одни и те же пуриновые основания — аденин и гуанин. Эти соединения представляют собой производные пурина, молекула которого состоит из пиримидинового и имидазольного колец.



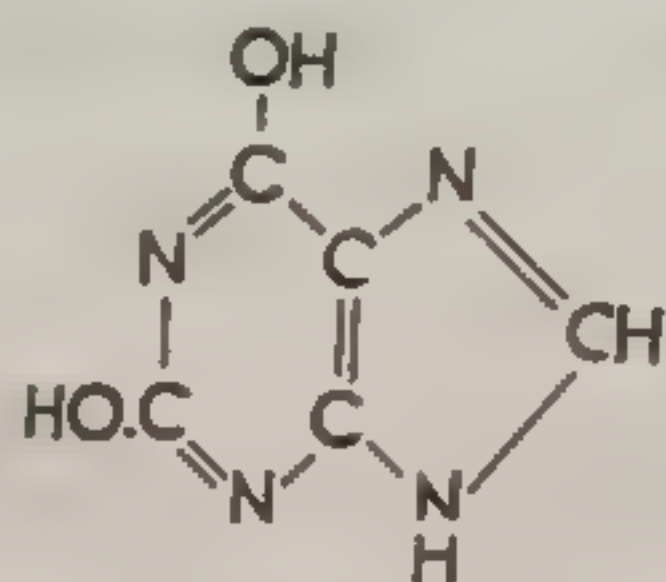
Аденин и гуанин имеют следующее строение:



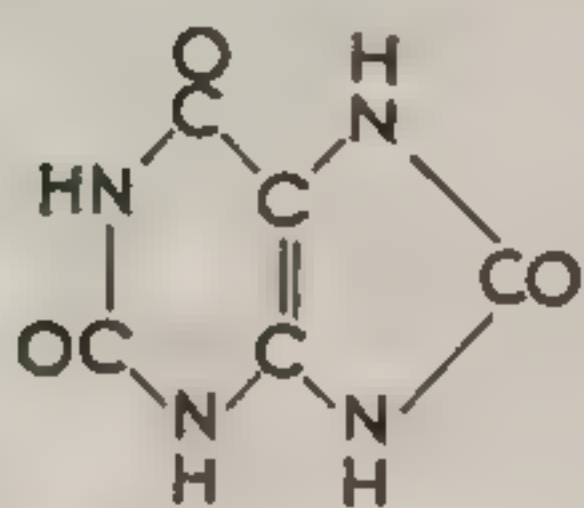
К другим природным производным пурина относятся гипоксантин, ксантин и мочевая кислота.



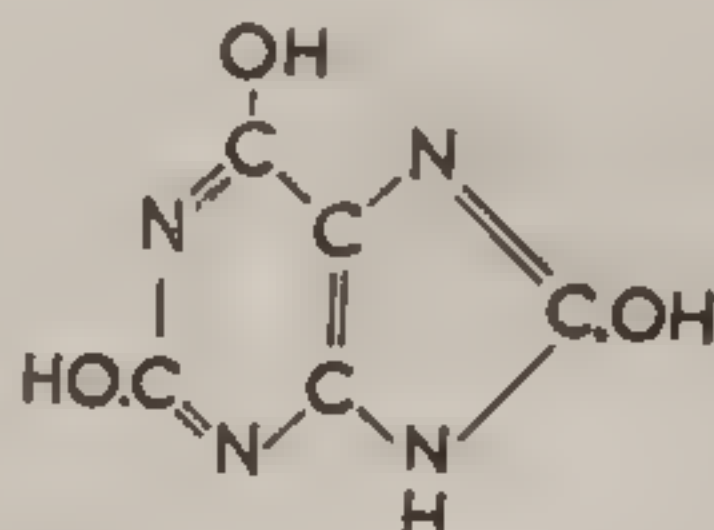
Гипоксантин
(6-оксипурин)



Ксантин
(2,6-диоксипурин)



Кетоформа



Енольная форма

Мочевая кислота
(2,6,8-триоксипурин)

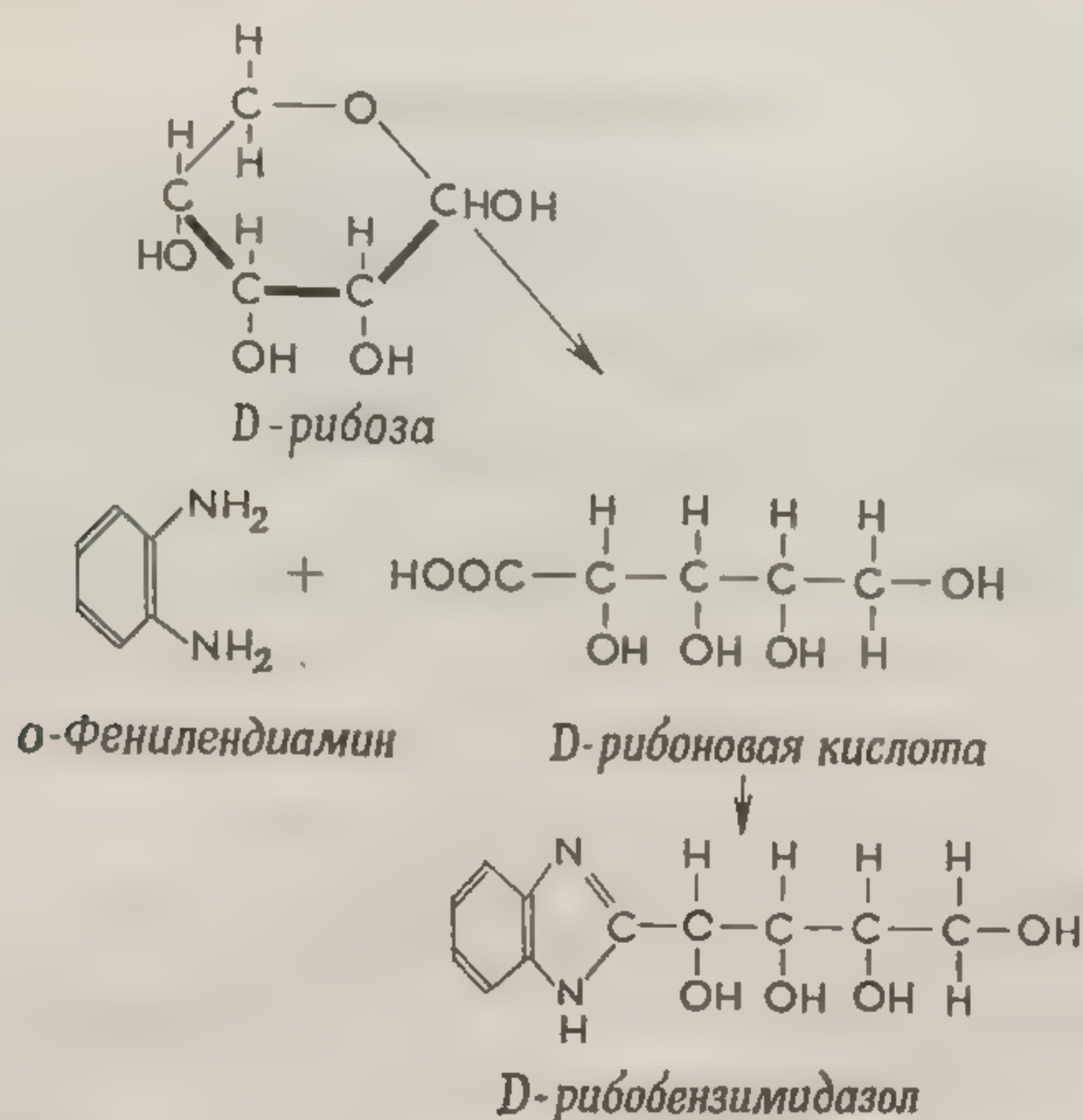
В некоторых нуклеиновых кислотах в небольших количествах присутствуют так называемые «минорные основания» [45, 46, 49, 54]. Например, растворимая РНК, или РНК-переносчик (*s*-РНК), может содержать такие метилированные основания, как 2-метил-аденин, 6-метиламинопурин, 6-диметиламинопурин, 1-метилгуанин, 6-окси-2-метиламинопурин, 5-метилцитозин и даже тимин [49]. (Более подробно *s*-РНК рассматривается на стр. 52 и 267.) Эти необычные для нуклеиновых кислот основания составляют 5% общего содержания оснований *s*-РНК, причем их относительное количество у разных видов различно.

Химия пиримидинов и пуринов рассматривается в обзорах Бендича [22] и Ульбрихта [35].

Пентозы

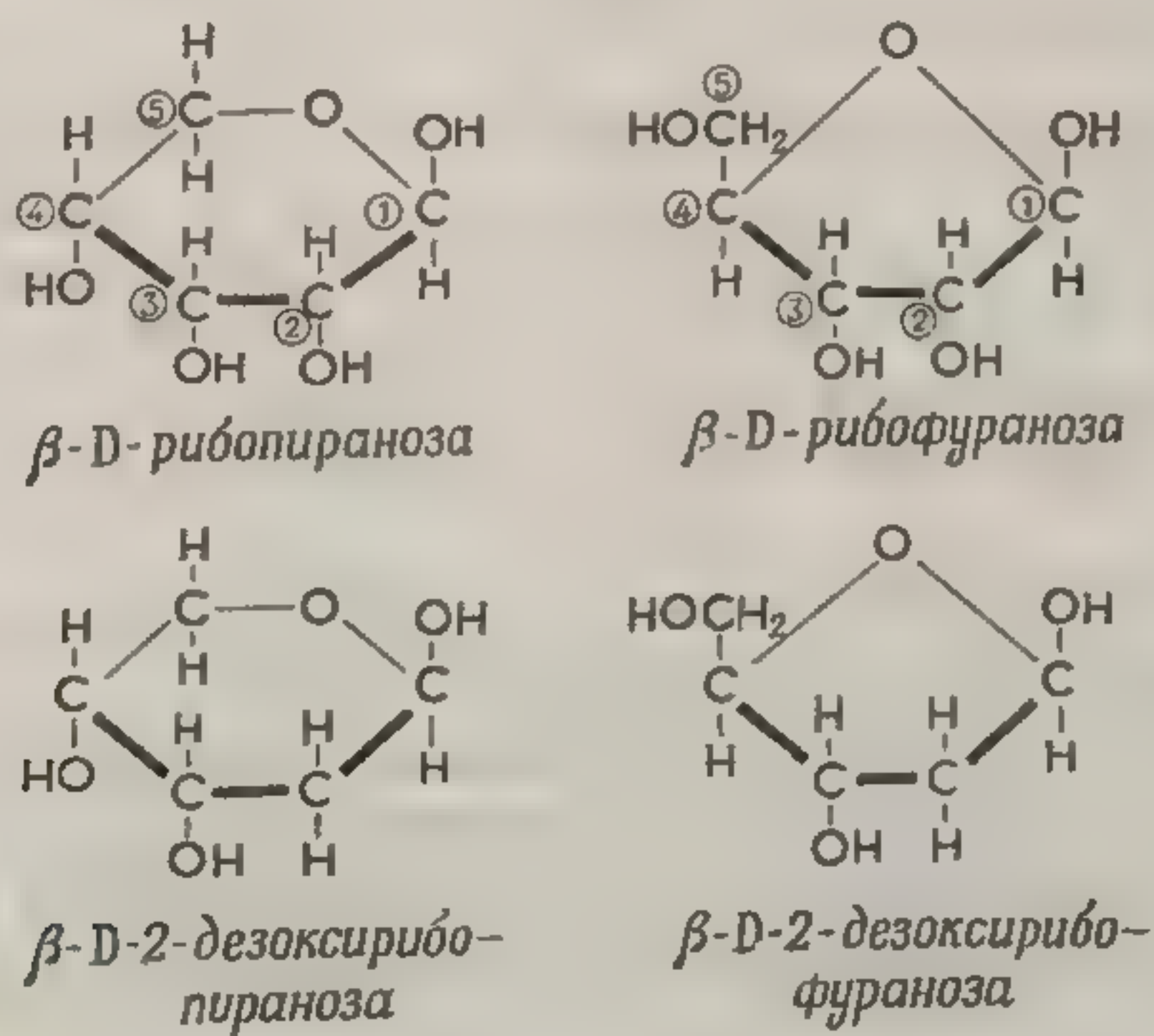
Уже давно было обнаружено, что нуклеиновая кислота, полученная первоначально из дрожжей, содержит пентозу. Пользуясь не вполне безупречными методами, Левин [1] в 1909 г. идентифицировал эту пентозу как рибозу. В дальнейшем Гуланд [2] и его сотрудники с несомненностью установили, что пентоза в дрожжевой РНК представляет собой D-рибозу. Альдоновая кислота из сахара, полученного в результате гидролиза пуриновых нуклеотидов дрожжевой РНК, была превращена ими в соответствующий бензимидазол, легко поддающийся идентификации.

Сахар, входящий в состав РНК печени, также оказался рибозой. Он был идентифицирован в виде *n*-бромфенилгидразона



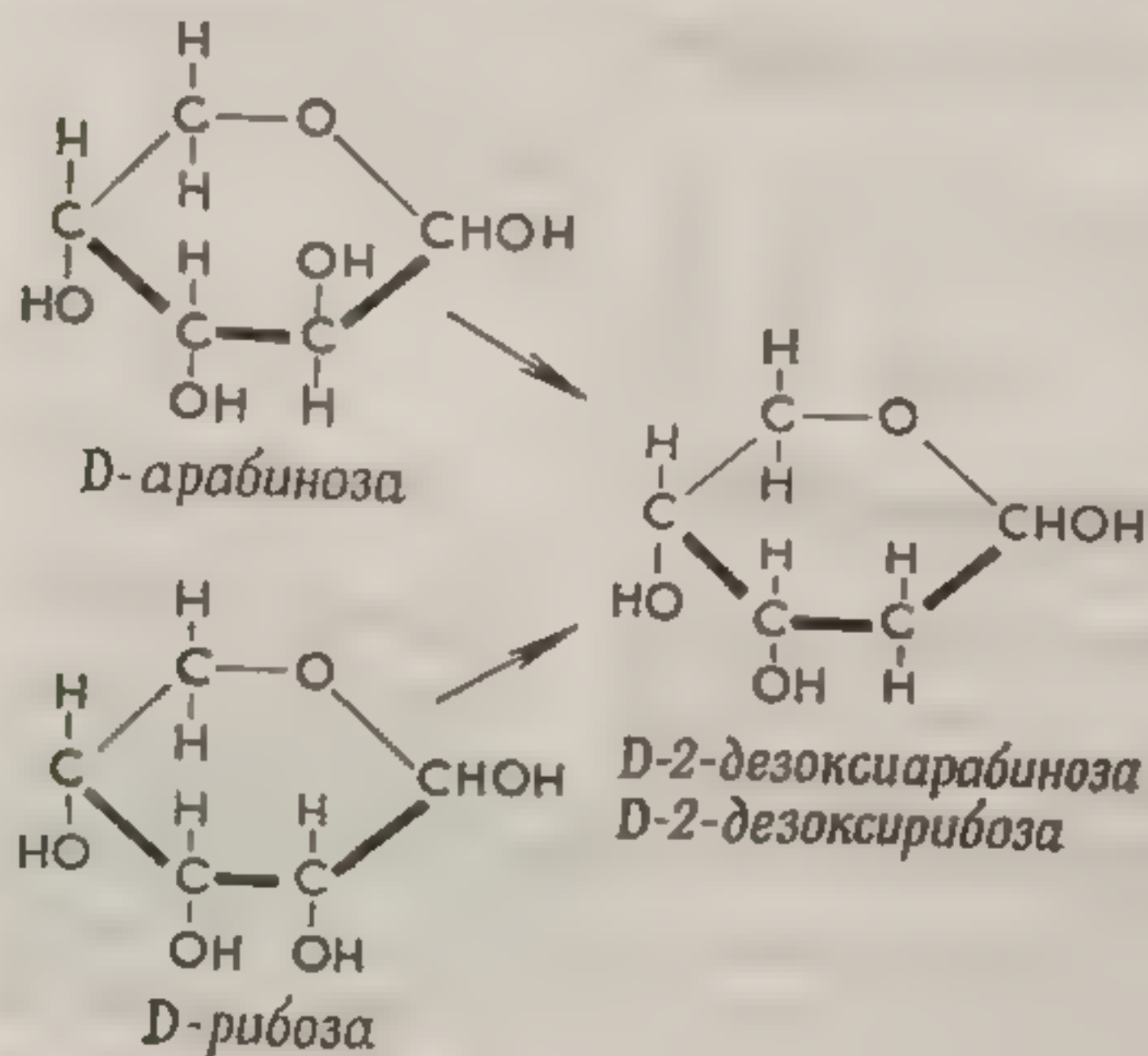
[3]. По данным хроматографического анализа, пентоза РНК, полученной из поджелудочной железы, печени, микобактерий туберкулеза, вируса желтой мозаики турнепса и вируса гриппа, идентична пентозе дрожжевой РНК [4, 6, 26]. Ввиду отсутствия сведений противоположного характера в настоящее время принято считать, что пентоза РНК всегда представлена D-рибозой. Пентозы, выделенные из различных штаммов вируса табачной мозаики (ВТМ), были идентифицированы как рибоза путем превращения их в ди-*n*-пропилмеркапталы [34].

Некоторые РНК содержат очень небольшие количества 2'(3')-*O*-метилрибозы.

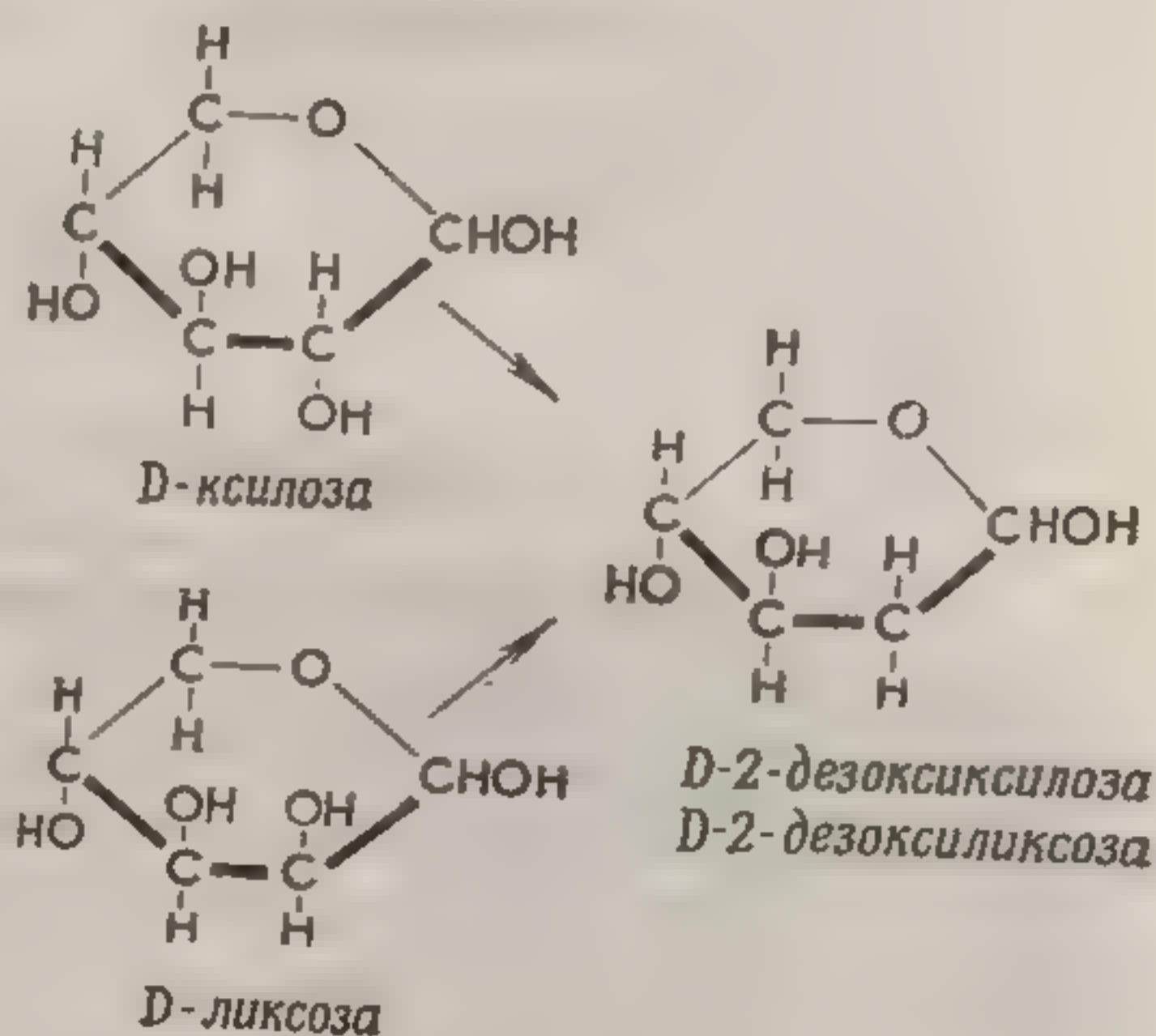


Дезоксипентозы

Вопрос о природе сахара, входящего в состав ДНК зубной железы, был разрешен Левином и Мори [7]. Эти исследователи выделили сахар из гуаниннуклеозида указанной нуклеиновой кислоты и установили, что он представляет собой дезоксипентозу. 2-дезоксипентоза может существовать лишь в двух формах — в форме дезоксирибозы (дезоксарабинозы), образующейся из рибозы и арабинозы (фиг. 1), и в форме дезоксииксикозы (дезоксиксикозы), образующейся из ксиллозы и ликсозы (фиг. 2).



Фиг. 1.



Фиг. 2.

По величине угла вращения плоскости поляризации синтетическая L-дезоксирибоза (и ее бензилфенилгидразон) совершенно сходна с дезоксипентозой ДНК из зубной железы, но отличаются от нее направлением вращения. Следовательно, углеводный компонент этой нуклеиновой кислоты может быть охарактеризован как D-2-дезоксирибоза.

По данным хроматографического анализа, сахара из ДНК различных тканей млекопитающих, разных микроорганизмов и спермы рыб идентичны с сахаром ДНК зубной железы [5, 8, 27]. Следовательно, все они являются, по-видимому, дезоксирибозой.

Джонс и Лаланд [28] выделили в кристаллическом виде сахар пуриновых нуклеозидов ДНК *Mycobacterium phlei* и показали, что он идентичен синтетической 2-дезокси-D-рибозе. Этот сахар был получен также из ДНК молока сельди и трески [40]. В молекулах ДНК, изолированной из некоторых штаммов бактериофага, глюкоза связана гликозидной связью с оксиметилцитозином (стр. 157).

Нуклеозиды

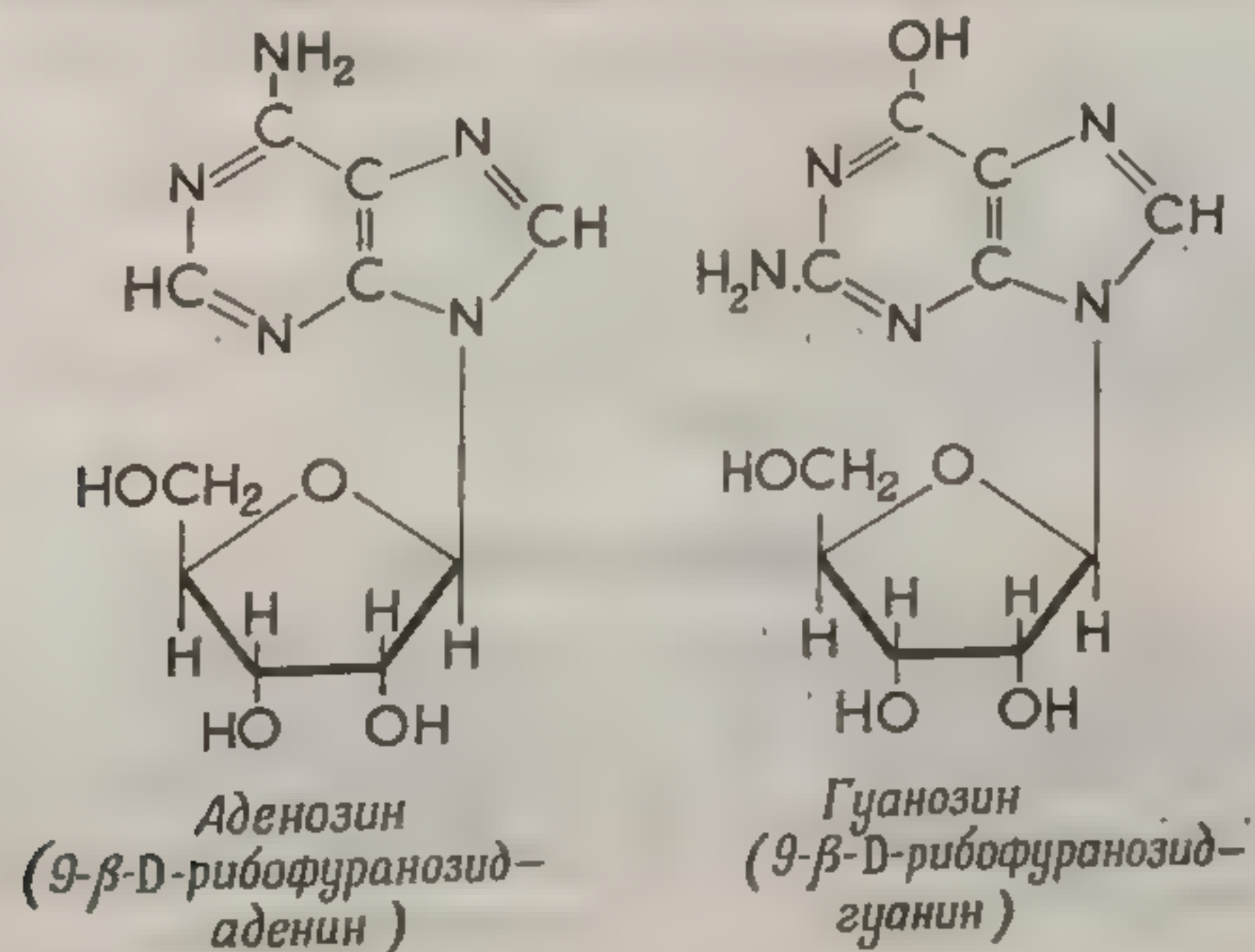
Соединение пуринового или пиримидинового основания с пентозой или дезоксипентозой приводит к образованию *нуклеозида*. Так, аденин, соединяясь с рибозой, образует нуклеозид *аденозин*, гуанин дает *гуанозин*, из цитозина образуется *цитидин*, из урацила — *уридин*. Рибонуклеозид, получаемый из гипоксантина, называется *инозином*.

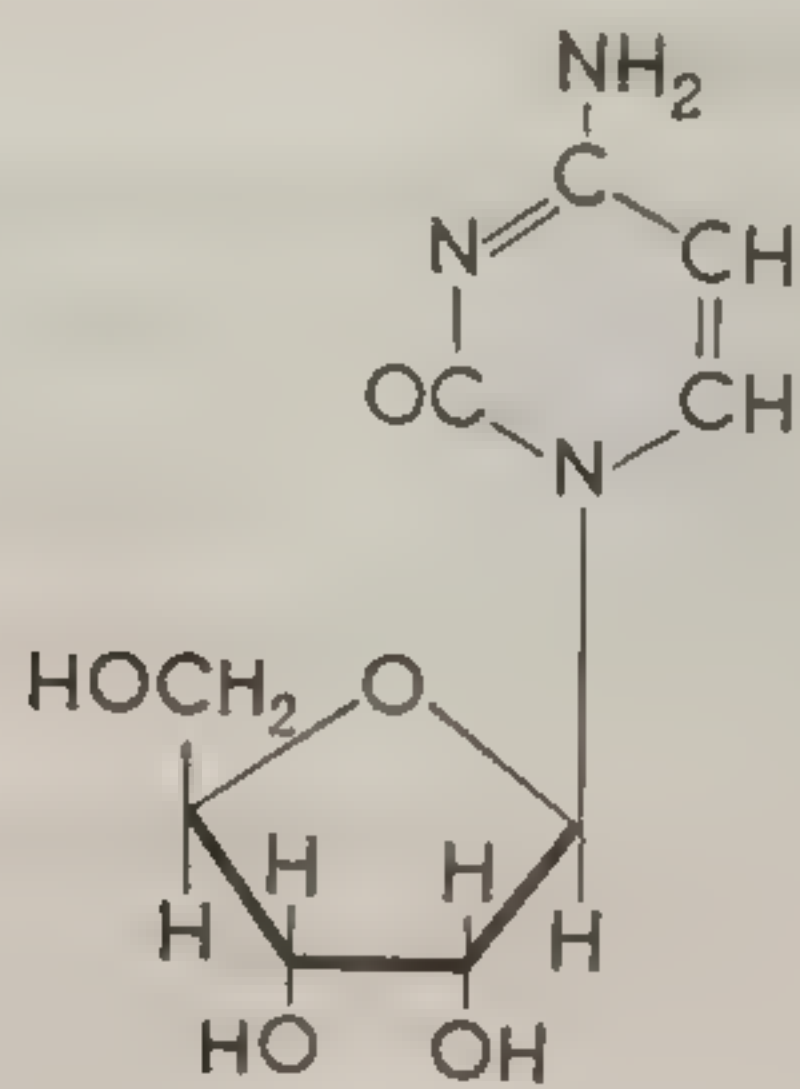
Ранними исследованиями Левина и его сотрудников [9] было установлено, что нуклеозиды относятся к числу циклических N-гликозидов и не обладают редуцирующей способностью до тех пор, пока в результате гидролиза не выделится свободный сахар. С помощью классических методов метилирования и гидролиза было показано, что в нуклеозиде сахар присутствует в виде фуранозы [10]; результаты окисления периодатом подтвердили эти данные [11]. Уридин можно превратить в N-метилуридин, дающий при гидролизе N-3-метилурацил [12]. Следовательно, пиримидиновые нуклеозиды являются N-1-гликозидами.

Результаты спектроскопического изучения пуриновых нуклеозидов привели Гуланда и его сотрудников [13] к заключению, что сахар связан с азотом, находящимся в положении 9 (N-9). Этот вывод был подтвержден Тоддом и его сотрудниками [14—17], которые в ходе синтеза соответствующих соединений также установили β -положение гликозидной связи.

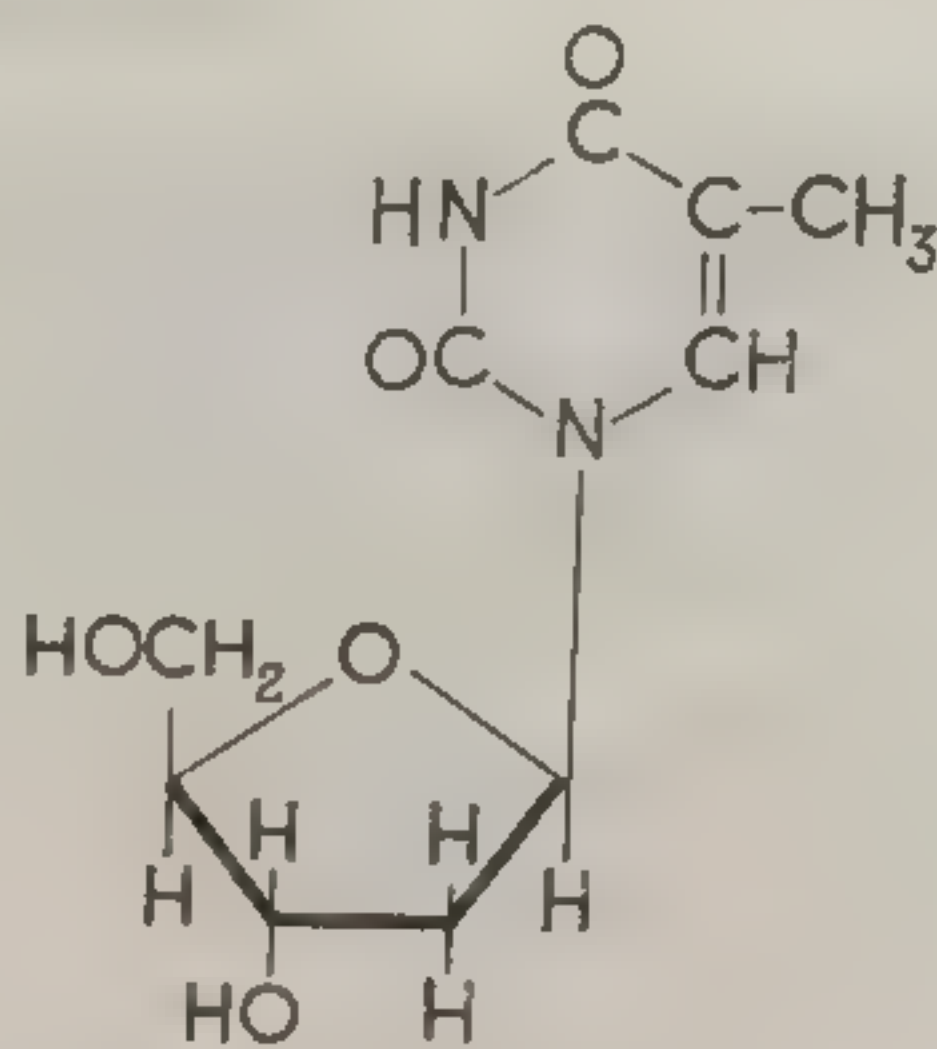
Аденозин синтетически получается следующим образом. Продукт реакции 2,8-дихлораденина с ацетохлор-D-рибофуранозой подвергается деацетиливанию с образованием 2,8-дихлор-9- β -D-рибофуранозидаденина. Гидрогенизация последнего соединения дает 9- β -D-рибофуранозидаденин, идентичный природному аденозину [17]. Другие нуклеозиды были синтезированы аналогичным способом [37, 47].

Рентгеноструктурный анализ подтвердил установленное химическими методами строение нуклеозидов





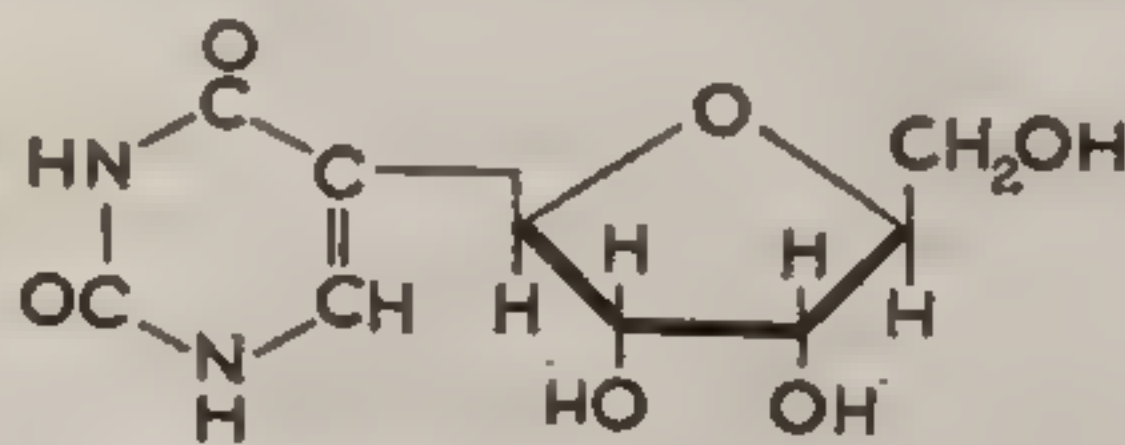
Цитидин
(3-β-D-рибофуранозид-
цитозин)



Тимидин
(3-β-D-2'-дезоксирibo-
фуранозидтимин)

Например, результаты двухмерного рентгеноструктурного анализа показали, что цитидин точно соответствует 3-β-рибофуранозидцитозину с плоским пиримидиновым кольцом, расположенным перпендикулярно к неплоскому рибофуранозному кольцу [38].

Среди продуктов расщепления РНК в небольших количествах присутствует нуклеозид 5-рибозилурацил, названный *псевдоуридином* [50, 55, 57]. Его особенно много в растворимой РНК (стр. 44); он был выделен в больших количествах из мочи [56].



Псевдоуридин (ψУ)
(5-β-D-рибофуранозилурацил)

Соответствующие нуклеозиды, получаемые из ДНК, представляют собой 9-β-D-2'-2-дезоксирибофуранозиды гуанина и аденина и 3-β-D-2'-дезоксифуранозиды цитозина и тимина [18, 19, 39, 41]. Обычно их называют соответственно *дезоксигуанозином*, *дезоксиаденозином*, *дезоксцитидином* и *тимидином*. Последнее соединение следовало бы, строго говоря, именовать *дезокситимидином* или *тиминдезоксирибонуклеозидом* (dT). Довольно редко встречающийся рибонуклеозид, в состав которого входят рибоза и тимин, получил название *риботимидина*.

Нуклеотиды

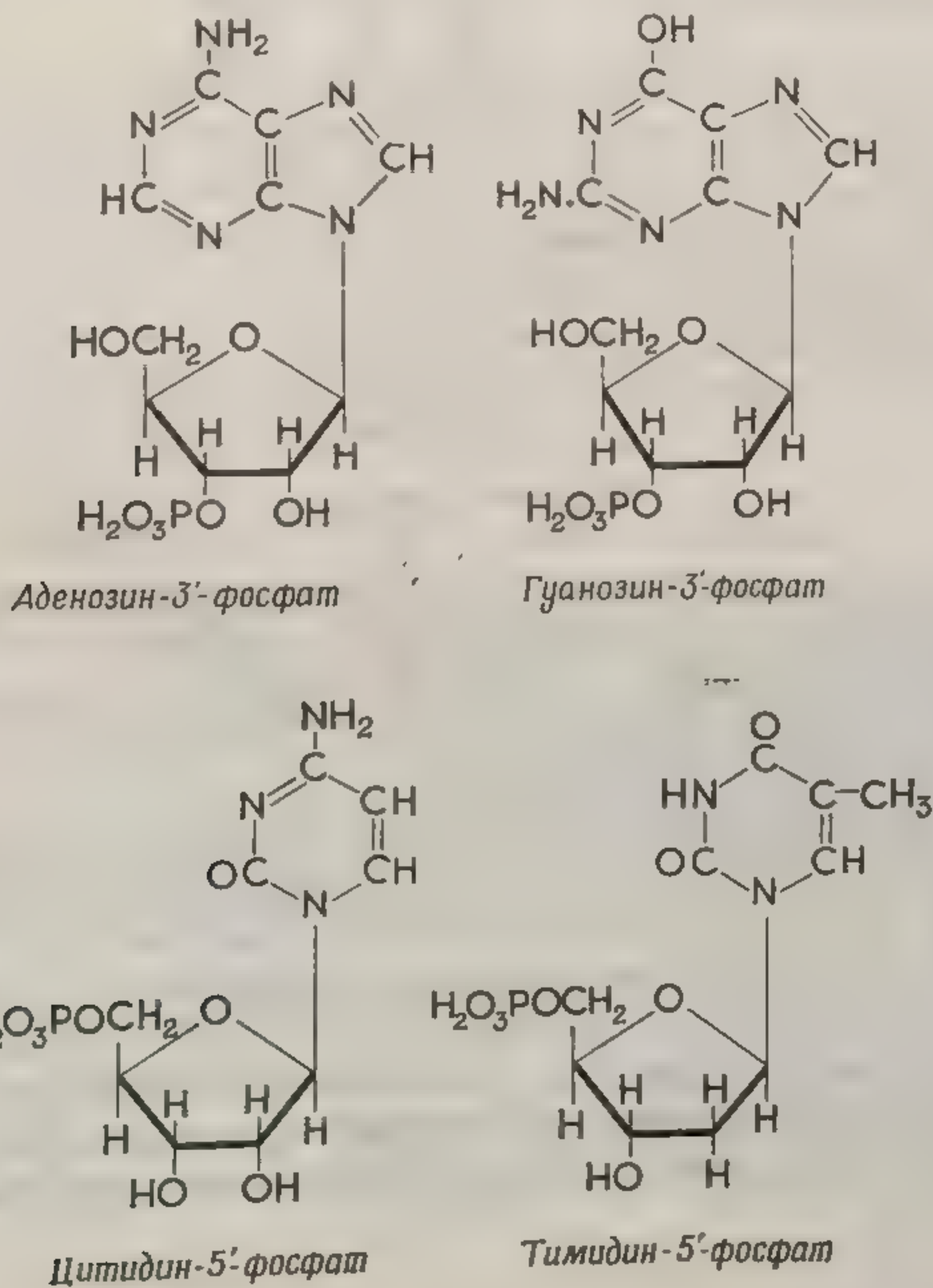
Подробное изложение данных о нуклеотидах можно найти в работе Хэтчинсона [58], опубликованной в этой же серии, а также в обзоре Ульбрихта [35]. Все нуклеотиды представляют собой фосфорные эфиры нуклеозидов. Нуклеотиды, получаемые из рибо-

нуклеозидов, обычно именуются *рибонуклеотидами*, а нуклеотиды, образующиеся из дезоксирибозонуклеозидов, — *дезоксирибонуклеотидами*. Прежде указанные термины обычно сокращались до *рибозида*, *риботида*, *дезоксирибозида* и *дезоксириботида*. Строго говоря, эти названия неверны и лучше избегать их употребления.

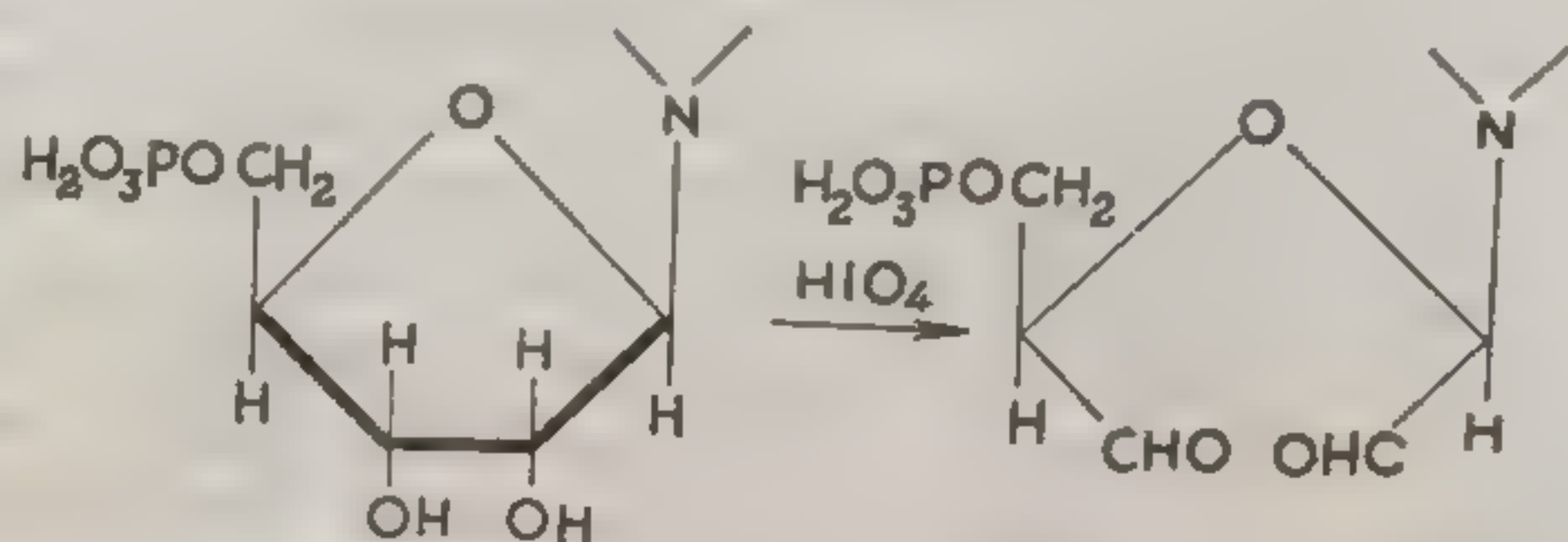
Рибозонуклеозиды содержат по 3 свободные гидроксильные группы в сахарном кольце. Поэтому возможно образование трех нуклеозидмонофосфатов. Так, из аденозина могут получиться 3 монофосфата (3 адениловые кислоты) — аденозин-5'-фосфат, аденозин-3'-фосфат и аденозин-2'-фосфат. Первое из этих соединений, обнаруженное в свободном состоянии впервые в мышцах, было названо мышечной адениловой кислотой; второе вещество, впервые полученное из щелочного гидролизата дрожжевой РНК, получило название дрожжевой адениловой кислоты.

Аналогичным путем из гуанозина, цитидина и уридина могут быть получены соответственно 3 гуанозинмонофосфата (гуаниловые кислоты), 3 цитидинмонофосфата (цитидиловые кислоты) и 3 уридинмонофосфата (уридиловые кислоты). Часто для их обозначения пользуются сокращениями, указанными в начале книги.

Ниже изображено строение нуклеозидмонофосфатов:

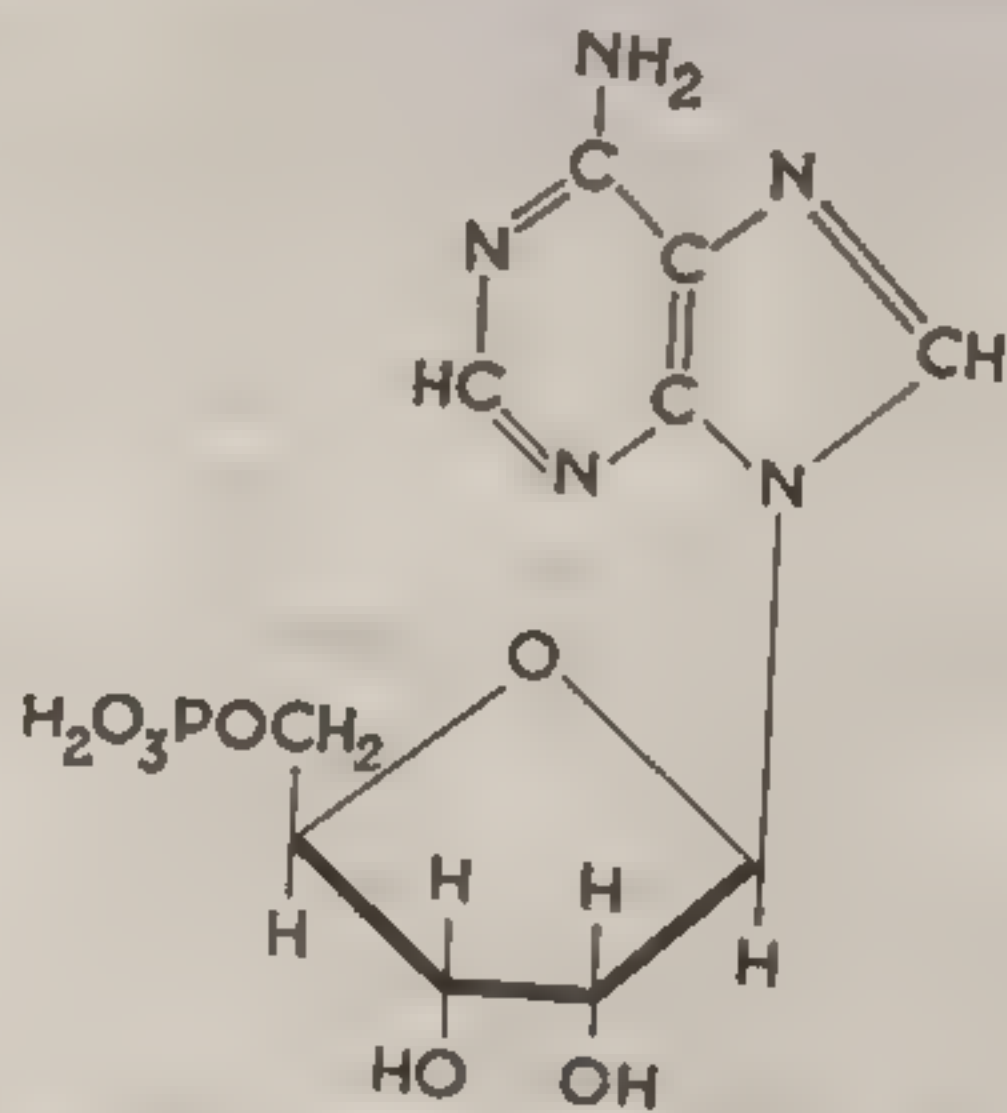


Рибонуклеозид-5'-фосфаты можно отделить от соответствующих 2'-или 3'-фосфатов благодаря чувствительности первых к окислению периодатом, обусловленной наличием двух *цис*-гидроксильных групп.



Однако этим способом нельзя отделить друг от друга дезоксирибонуклеозид-3'- и дезоксирибонуклеотид-5'-фосфаты, поскольку в этом случае отсутствуют гидроксильные группы при С-2.

Ниже указано строение аденозин-5'-фосфата, подтвержденное его синтезом [24]. При дезаминировании он образует инозин-5'-фосфат (инозиновая кислота) — нуклеотид, содержащий гипоксантин.



Аденозин-5'-фосфат

Дальнейшее фосфорилирование нуклеозид-5'-фосфатов в положении 5' приводит к образованию ди- и трифосфатов. Таким путем из аденозин-5'-фосфата (АМФ) получают аденозиндифосфат (АДФ) и аденозинтрифосфат (АТФ). Было установлено также образование аденозинтетрафосфата.

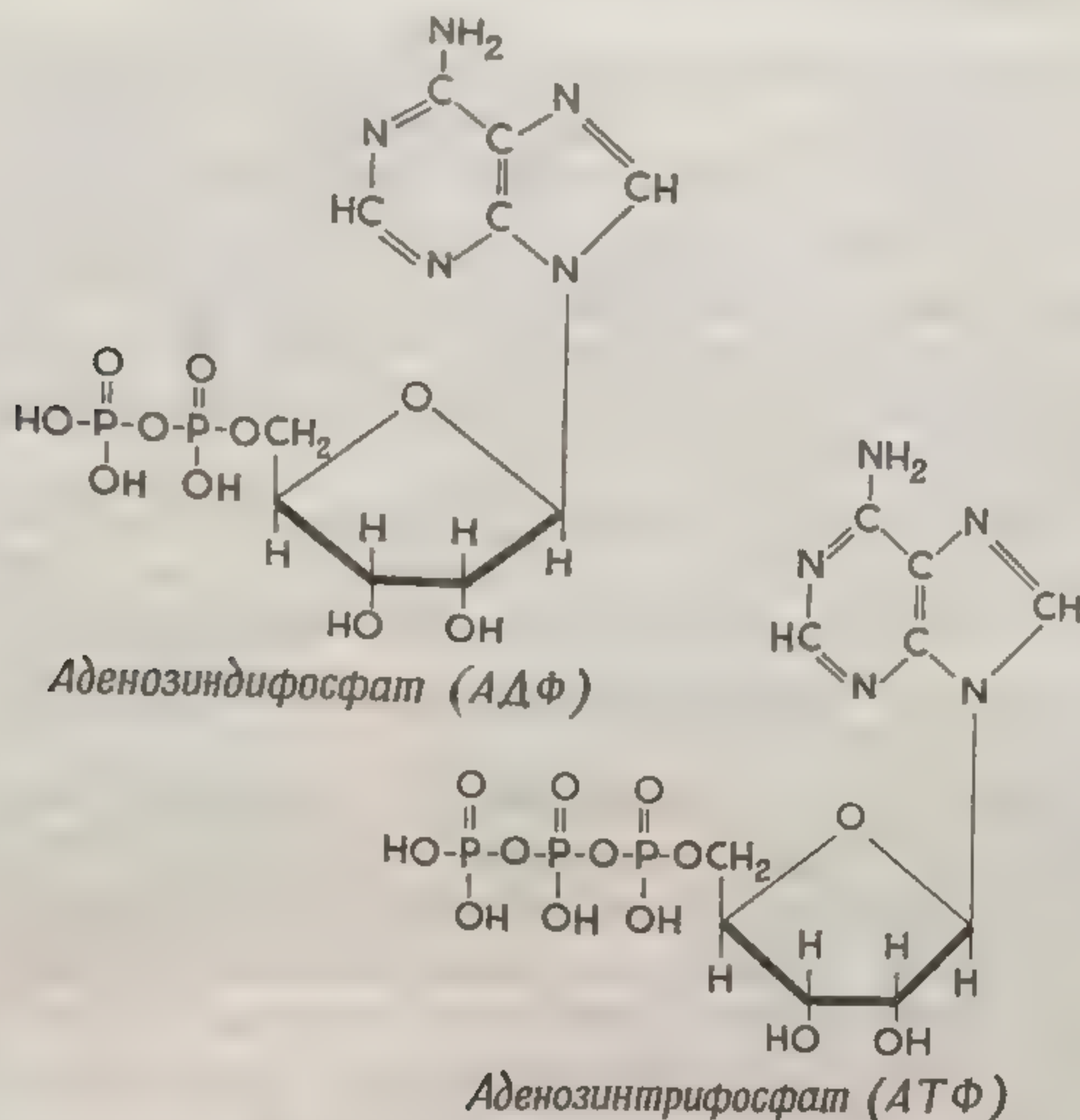
О правильности приведенных структурных формул этих соединений свидетельствуют данные, полученные при их окислении периодатом [11], а также результаты синтеза [24, 25].

Аналогичным образом остальные нуклеозид-5'-фосфаты дают такие ди- и трифосфаты, как ГДФ, ЦДФ, УДФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ. 5'-монофосфаты аденозина, гуанозина, цитидина и уридина, а также соответствующие ди- и трифосфаты находятся в клетке в свободном состоянии и могут быть экстрагированы разбавлен-

ной ки
фии (см
В у
2',3'-ци
ческий
В к
[51] обн
рибонук
дов обр
биологи

Мног
тидами
тинамид
являющ
динукл
ниях сах
[30], а Г
(стр. 170

Практ
новых к
цией Ко



ной кислотой [42]. Их можно разделить при помощи хроматографии (см. стр. 32).

В ходе дальнейшего изложения (стр. 85) будут описаны 2',3'-циклические монофосфаты, из которых аденозин-3',5'-циклический монофосфат играет определенную физиологическую роль.

В кислых экстрактах из зубной железы [43] и других тканей [51] обнаружены моно-, ди- и трифосфаты пиримидиновых дезоксирибонуклеозидов. Ди- и трифосфаты всех 4 дезоксирибонуклеозидов образуются из соответствующих монофосфатов в результате биологического фосфорилирования [53].

Коферменты нуклеотидного строения

Многие биологически важные соединения представлены нуклеотидами [48, 58]. К ним относятся коферменты, например никотинамиднуклеотиды, флавинадениндинуклеотид и кофермент А, являющиеся сложными производными АМФ. Коферменты уридиннуклеотидного строения [29] принимают участие в превращениях сахаров, ЦТФ имеет значение при биосинтезе фосфолипидов [30], а ГТФ участвует в биосинтезе белков (стр. 267) и аденина (стр. 176).

Методы получения

Практические методы получения продуктов гидролиза нуклеиновых кислот подробно описаны в сборнике, изданном под редакцией Коловика и Каплана [44].

При кипячении РНК в слабой кислоте происходит гидролиз пуриновых нуклеотидов с освобождением легко изолируемых аденина и гуанина, а также рибозы и фосфорной кислоты. Пиримидиновые нуклеотиды более устойчивы к гидролизу; для их разрушения с освобождением цитозина и урацила пиримидиновые нуклеотиды необходимо нагревать с кислотой в автоклаве или в запаянной пробирке [33]. В течение этого процесса цитозин обычно дезаминируется до урацила.

Гидролиз нуклеиновых кислот до составляющих их оснований можно производить также путем нагревания их в течение 1 час при 100° в 12 н. хлорной кислоте. Для разделения и выделения оснований удобнее пользоваться колонкой из ионообменной смолы, например дауэкс-50.

Рибонуклеозид-2'- и рибонуклеозид-3'-фосфаты получают, подвергая РНК щелочному гидролизу и разделяя образующиеся нуклеотиды при помощи ионообменной хроматографии. Гидролиз РНК под действием диэстеразы змеиного яда (стр. 92) приводит к образованию нуклеотид-5'-фосфатов, которые могут быть разделены хроматографически с использованием вспомогательной шкалы. Нуклеозид-5'-фосфаты можно выделить также из кислото-растворимой фракции животных тканей. В большинстве тканей содержание нуклеотидов аденина значительно выше, чем нуклеотидов других оснований.

Если ДНК подвергается действию соответствующих ферментов (стр. 90), то образуется смесь дезоксирибонуклеозид-5'- или 3-фосфатов, которую можно разделить хроматографией на колонках дауэкс-1 или дауэкс-2 [31].

Подробно хроматографическое разделение нуклеотидов описано в обзоре Кона [32].

Нуклеозиды обычно получают путем дефосфорилирования нуклеотидов при помощи препаратов соответствующих моноэстераз (стр. 96).

ЛИТЕРАТУРА

1. Levene P. A., Jacobs W. A., Ber. dtsch. chem. Ges., 42, 2102, 2469, 2474, 2703 (1909).
2. Barker G. R., Gulland J. M., J. Chem. Soc., p. 625 (1943).
Barker G. R., Farrar K. R., Gulland J. M., J. Chem. Soc., p. 21 (1947).
3. Davidson J. N., Weymouth C., Biochem. J., 38, 375 (1944).
4. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., 176, 715 (1948).
5. Vischer E., Zamenhof S., Chargaff E., J. Biol. Chem., 177, 429 (1949).
6. Schwerdt C. E., Loring H. S., J. Biol. Chem., 167, 593 (1947).
7. Levene P. A., Mori T., J. Biol. Chem., 83, 803 (1929).
8. Chargaff E., Vischer E., Doniger R., Green C., Misani F., J. Biol. Chem., 177, 405 (1949).

9. Levene P. A., Bass L. W., Nucleic Acids, New York, Chemical Catalog Company (1931).
10. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 97, 491 (1932); *ibid.*, 101, 529 (1933).
11. Todd A. R., J. Chem. Soc., p. 647 (1946).
12. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 104, 385 (1934).
13. Gulland J. M., J. Chem. Soc., p. 1722 (1938).
14. Lythgoe B., Smith H., Todd A. R., J. Chem. Soc., p. 355 (1947).
15. Howard G. A., Kenner G. W., Lythgoe B., Todd A. R., J. Chem. Soc., p. 861 (1946).
16. Howard G. A., Lythgoe B., Todd A. R., J. Chem. Soc., p. 556, 1052 (1945).
17. Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., J. Chem. Soc., p. 833 (1946); *ibid.*, 967 (1948).
18. Gulland J. M., Symposium Soc. Exp. Biol., 1, 1 (1947); Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12, 95 (1947).
19. Lythgoe B., Todd A. R., Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 15 (1947).
20. Levene P. A., Harris S. A., J. Biol. Chem., 98, 9 (1932).
21. Gulland J. M., Smith H., J. Chem. Soc., p. 338 (1947).
22. Bendich A., The Nucleic Acids (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press, Vol. 1, p. 81 (1955).
23. Dunn D. B., Smith J. D., Biochem. J., 68, 627 (1958).
24. Baddiley J., Todd A. R., J. Chem. Soc., p. 648 (1947).
25. Baddiley J., Michaelson A. M., Todd A. R., Nature, 161, 761 (1948); J. Chem. Soc., 582 (1949).
26. Ada G. L., Gottshalk, Biochem. J., 62, 686 (1956).
27. Chargaff E., Lipshitz R., J. Amer. Chem. Soc., 75, 3658 (1953).
28. Jones A. S., Laland S. G., Acta Chem. Scand., 8, 603 (1954).
29. Leloir L. F., 3rd Internat. Cong. Biochem. (Conférences et Rapports), p. 154 (1955).
30. Kennedy E. P., Weiss S. B., J. Amer. Chem., 77, 250 (1955).
31. Cohn W. E., Volkin E., Khym J. X., Biochemical Preparations, 5, 49 (1957).
32. Cohn W. E., Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan), Vol. III, p. 724 (1957).
33. Hunter A., Hlynka I., Biochem. J., 31, 486 (1937).
34. MacDonald D. L., Knight C. A., J. Biol. Chem., 202, 45 (1953).
35. Ulbricht T. L. V., Purines, Purimidines and Nucleotides, London, Pergamon (1964).
36. Carter C. E., Cohen L. H., J. Biol. Chem., 222, 17 (1956).
37. Baddiley J., The synthesis of purine nucleotides. Royal Institute of Chemistry Lectures, Monographs and Reports, No. 3 (1950).
38. Furberg S., Acta Chem. Scand., 4, 751 (1950).
39. Brown D. M., Lythgoe B., J. Chem. Soc., p. 1990 (1950).
40. Laland S. G., Overend W. G., Acta Chem. Scand., 8, 192 (1954).
41. Manson L. A., Lampen J. P., J. Biol. Chem., 191, 87 (1951).
42. Schmitz H., Hurlbert R. B., Potter V. R., J. Biol. Chem., 209, 41 (1954).
43. Potter R. L., Schlesinger S., J. Amer. Chem. Soc., 77, 6714 (1955).
44. Colowick S. P., Kaplan N. O. (Eds.), Methods in Enzymology, Vol. III, Section V (1957).
45. Adler M., Weissman B., Gutman A. B., J. Biol. Chem., 230, 717 (1958).
46. Littlefield J. W., Dunn D. B., Biochem. J., 70, 642 (1958).
47. Fox J. J., Record of Chemical Progress, 19, 173 (1958).

48. Henderson F. J., LePage G. A., Chem. Rev., 58, 645 (1958).
49. Smith J. D., Dunn D. B., Biochem. J., 72, 294 (1959).
50. Cohn W. E., Biochim. Biophys. Acta, 32, 569 (1959).
51. Schneider W. C., J. Nat. Can. Inst., 18, 569 (1957).
52. Dunn D. B., Biochim. Biophys. Acta, 34, 286 (1959).
53. Keir H. M., Smellie R. M. S., Biochim. Biophys. Acta, 35, 405 (1959).
54. Davis F. F., Carlucci A. F., Roubain I. F., J. Biol. Chem., 234, 1525 (1959).
55. Scannell J. P., Crestfield A. M., Allen F. W., Biochim. Biophys. Acta, 32, 406 (1959).
56. Biochemical Preparations, 10, 135 (1963).
57. Cohn W. E., J. Biol. Chem., 235, 1488 (1960).
58. Hutchinson D. W., Nucleotides and Coenzymes, London, Methuen (1964).

О
бнок
хром
и пи
прим
нукле
болнз
тогра
1.
небол
[3, 4]
2.
разде
3.
для р
зидов

Оп
или
и ДН
боткой
или 12
из эти
в перв
разру
обраб
теряет
до сме
достиг
при 10
нукле
при 37
крепко

ГЛАВА III

ХРОМАТОГРАФИЯ И ПОГЛОЩЕНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ

Введение

Одним из основных факторов, обусловивших быстрое развитие биохимии нуклеиновых кислот после 1945 г., была разработка хроматографических методов, пригодных для разделения пуринов и пиримидинов и их производных. Эти методы нашли широкое применение не только при определении нуклеотидного состава нуклеиновых кислот, но и при изучении различных сторон метаболизма нуклеиновых кислот [3, 4, 5, 6, 17]. Все известные хроматографические методы можно разделить на 3 группы:

1. Хроматография на бумаге, особенно удобная для разделения небольших количеств пуриновых и пиримидиновых оснований [3, 4].

2. Ионофорез на бумаге, применяемый преимущественно для разделения небольших количеств нуклеотидов [12, 13].

3. Хроматография на колонке ионообменных смол, удобная для разделения довольно больших количеств оснований, нуклеозидов и особенно нуклеотидов [6, 7, 15].

Гидролиз

Определению нуклеотидного состава нуклеиновой кислоты тем или иным методом должен предшествовать ее гидролиз. РНК и ДНК можно гидролизовать до входящих в них оснований обработкой 98%-ной муравьиной кислотой при 175° в течение 30 мин или 12 н. хлорной кислотой при 100° в течение 1 час [8, 9]. Ни один из этих методов не является строго количественным, поскольку в первом случае наблюдается низкий выход урацила, а во втором — разрушение части тимина. ДНК можно гидролизовать также обработкой 6 н. HCl при 120° в течение 2 час, однако при этом теряется часть пуринов [25]. Удовлетворительный гидролиз РНК до смеси пуриновых оснований и пиримидиновых нуклеотидов достигается в результате нагревания с 1 н. соляной кислотой при 100° в течение 1 час [5]. Количественный гидролиз РНК до нуклеозид-3'-фосфатов легко вызвать обработкой 0,3 н. NaOH при 37° в течение 16 час. Следует избегать употребления слишком крепкой щелочи, чтобы не вызвать дезаминирования цитидиловой

кислоты. К сожалению, соответствующий гидролиз ДНК до нуклеотидов может быть осуществлен только ферментативно (гл. V).

Хроматография на бумаге

Подробное описание применения метода хроматографии на бумаге для разделения пуриновых и пиримидиновых производных можно найти в многочисленных обзорах, посвященных этому вопросу [9, 16, 17, 18]. Вкратце хроматография сводится к следующему. Небольшое количество гидролизата, полученного одним из описанных выше методов, наносят вблизи одного конца полоски фильтровальной бумаги, после чего производят обычные для одномерной хроматографии операции с использованием таких растворителей, как насыщенный водой *n*-бутанол. Конец полоски фильтровальной бумаги вблизи пятна гидролизата погружают в лоток с растворителем; другой конец полоски свободно подвешивают под стеклянным колпаком, накрывающим всю систему. Под ним создается атмосфера, насыщенная парами растворителя. Растворитель медленно передвигается по фильтровальной бумаге, увлекая за собой основания или нуклеотиды. При этом различные соединения передвигаются с различной скоростью, что и делает возможным их разделение. Примерно через 24 час бумагу вынимают и высушивают, отметив предварительно положение фронта растворителя. Затем определяют положение пятен отдельных оснований или нуклеотидов. Для этого обычно пользуются наиболее быстрым методом Холлидея и Джонсона [10], который состоит в просматривании пятен непосредственно в ультрафиолетовых лучах, прошедших через подходящий фильтр. С целью сохранения результатов получают отпечатки хроматограммы на специальной фотобумаге, облученной при подходящих условиях ультрафиолетом. Белые пятна на темном фоне такого отпечатка соответствуют веществам (основаниям), поглощающим ультрафиолет (Маркхэм и Смит [5]). Один из подобных отпечатков приведен на фиг. 3.

При помощи этих методов можно установить положение пятен и определить, как далеко то или иное соединение отошло от места нанесения гидролизата. Частное от деления этого расстояния на путь, пройденный растворителем от места старта, дает величину R_f для данного вещества в данном растворителе.

Одномерная, а тем более двухмерная хроматография на бумаге особенно удобна для разделения смеси свободных оснований, получаемой в результате гидролиза РНК или ДНК в сильной кислоте. При этом наилучшие результаты обычно получают при использовании в качестве растворителей таких смесей, как изопропанол — концентрированная HCl — вода [9] и *n*-бутанол — концентрированный NH_4OH — вода [11]. Аналогичные методы

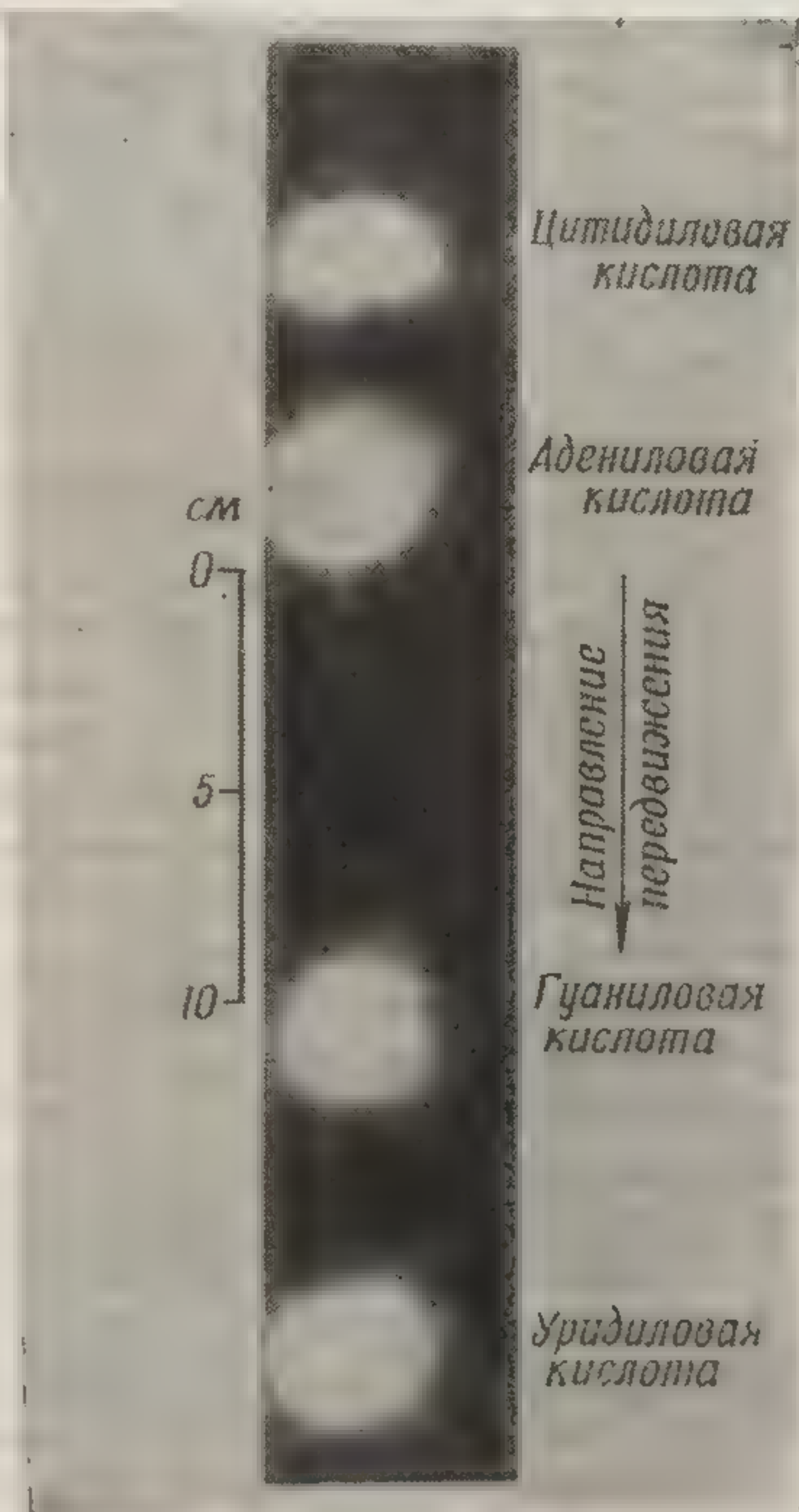
можно применять и для разделения смеси пуриновых оснований и пиримидиновых нуклеотидов, получаемой при мягком кислотном гидролизе РНК.

Двухмерная хроматография на бумаге успешно используется для разделения кислоторастворимых нуклеотидов в тканевых экстрактах [29]. Кислый экстракт предварительно очищают, адсорбируя нуклеотиды на активированном угле и элюируя их соответствующим растворителем.

Метод хроматографии на бумаге можно использовать и для количественных определений. После того как установлено расположение пятен, бумагу разрезают на куски, каждый из которых соответствует определенному пятну. Из этих кусков бумаги основание или нуклеотид элюируют кислотой. Количество каждого основания можно определить по оптической плотности кислого экстракта в соответствующей области ультрафиолетовой части спектра, если известны молярные коэффициенты экстинкции. Измерения производят при помощи подходящего спектрофотометра. Таким путем определяют от 5 до 40 мкг адсорбированных на бумаге веществ.

Ионофорез на бумаге

Один из недостатков современных методов хроматографии на бумаге состоит в том, что они не дают возможности быстро и легко разделять смесь рибонуклеозид-3'-фосфатов, получаемую при мягком щелочном гидролизе РНК. Такое разделение можно осуществить при помощи ионофореза, используя подвижность нуклеотидов в электрическом поле [12, 13, 55].



Фиг. 3. Разделение методом ионофореза на бумаге четырех нуклеотидов, полученных из дрожжевой РНК путем щелочного гидролиза [12]. Фотография снята в ультрафиолете.

Точно измеренное количество гидролизата наносят на один конец длинной полоски фильтровальной бумаги. Бумагу увлажняют цитратным буфером с pH 3,5 и подвешивают на стеклянной палочке таким образом, что концы оказываются погруженными в чашки с буферным раствором, в которые помещают электроды. Во время ионофореза бумагу охлаждают в бане с четыреххлористым углеродом [13]. После ионофореза бумагу высушивают и положение пятен устанавливают таким же образом, как описано выше для хроматограмм. Пример разделения, осуществленного этим методом, приведен на фиг. 3. Метод ионофореза был усовершенствован Эдстрёмом [14, 52, 58] настолько, что теперь стало возможным разделять на волокнах целлюлозы нуклеотиды, полученные из нуклеиновых кислот одной клетки.

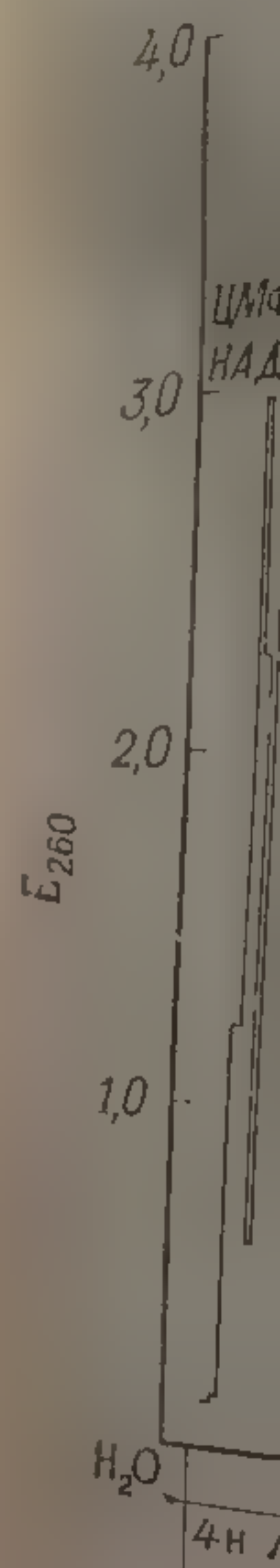
Хроматография на колонке

Хроматография на бумаге и ионофорез на бумаге очень удобны для разделения небольших количеств исследуемого материала. Для разделения больших количеств оснований, нуклеозидов и нуклеотидов в настоящее время широко используется хроматография на колонках из ионообменных смол. Впервые эти методы были предложены Коном и его сотрудниками [6, 7], которые пользовались колонками из катионообменной смолы дауэкс-50 и анионообменной смолы дауэкс-1 и дауэкс-2. Смесь нуклеотидов поглощается колонкой, через которую затем пропускают элюирующий раствор, содержащий конкурентный ион. Элюат собирают небольшими фракциями и в каждой из них определяют концентрацию основания или нуклеотида, используя для измерения оптической плотности ультрафиолетовый спектрофотометр.

Хроматография на колонке пригодна для разделения не только различных оснований или их производных, но и для разделения чрезвычайно близких по строению производных, например 2'-, 3'- и 5'-фосфатов одного и того же нуклеозида.

В большинстве систем, используемых для разделения производных нуклеиновых кислот при помощи хроматографии на колонке, концентрация элюента увеличивается ступенчато. В некоторых случаях, например при разделении сложной смеси нуклеотидов, более пригоден метод градиентной элюции на анионообменной смоле. При pH такой колонки (pH 7—8) суммарный заряд нуклеотидов оказывается отрицательным, причем с понижением pH заряд уменьшается и притяжение нуклеотидов к смоле ослабевает. Это достигается путем пропускания через смолу растворов соответствующей кислоты во все возрастающих концентрациях для последовательной элюции отдельных нуклеотидов. Затем для элюции нуклеотидов, более прочно удерживаемых смолой, к

раствор
постепенно
берг. И
нукле
для элю
кислот

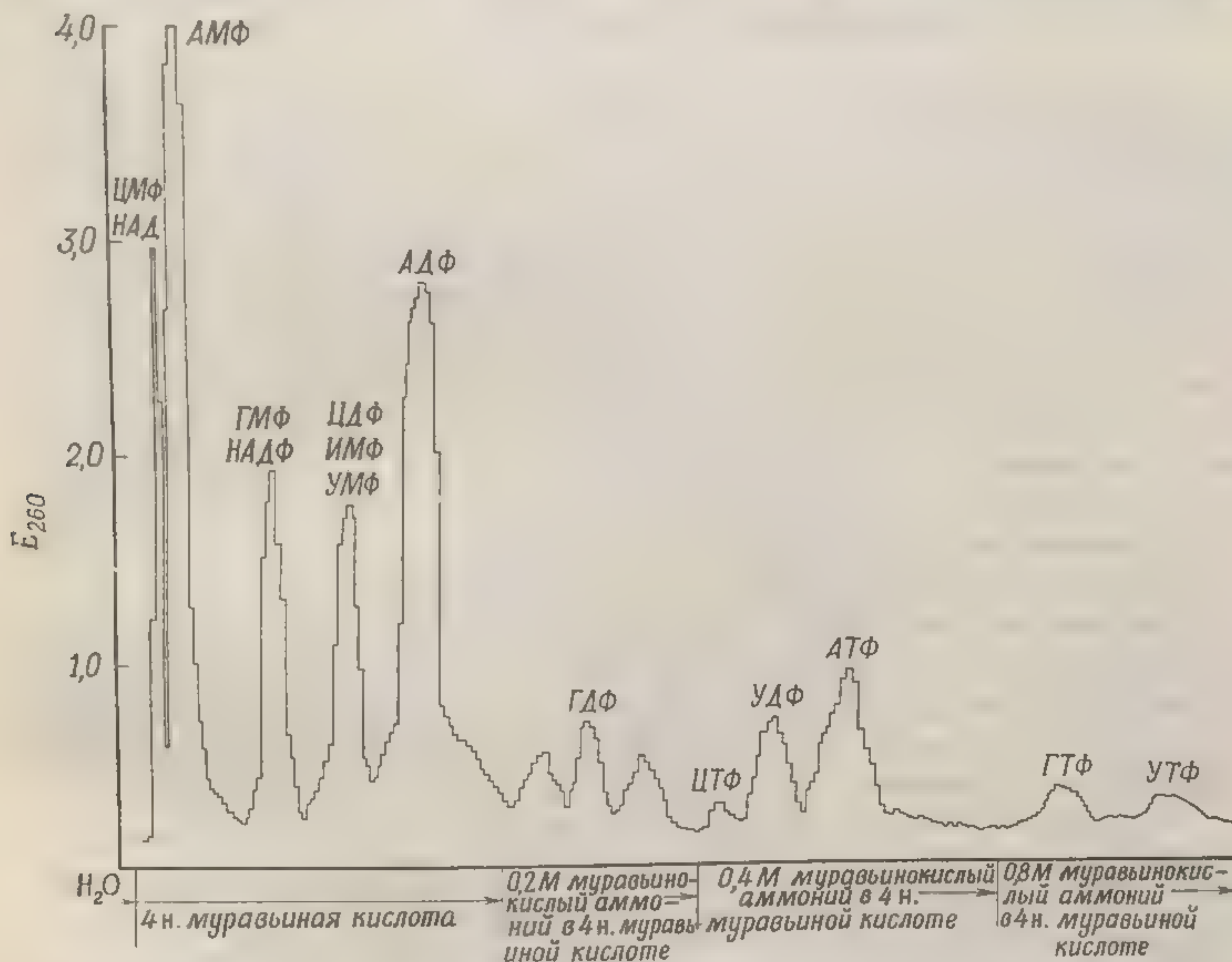


Фиг. 4. П
адсорбиро
диентной

аммоний.
затем дв
разделен
из целлю

Хрома
ленин)
дезоксир
3 Дж. Дж

раствору кислоты, пропускаемому через колонку, добавляют постепенно увеличивающиеся количества соли. Например, Хрёлберт, Шаутц, Брумм и Поттер [15] разделяли кислоторастворимые нуклеотиды животных тканей на колонках из дауэкс-1, используя для элюции равномерно возрастающие концентрации муравьиной кислоты, к которой постепенно добавляли муравьинокислый



Фиг. 4. Профиль элюции нуклеотидов кислого экстракта ткани печени, адсорбированных на колонке с дауэкс-1 и выделенных при помощи градиентной элюции возрастающими концентрациями муравьиной кислоты, к которой добавляли муравьинокислый аммоний.

аммоний. Таким путем получали сначала нуклеозидмонофосфаты, затем дифосфаты и, наконец, трифосфаты. Пример подобного разделения приведен на фиг. 4. Применяются также колонки из целлюлозы [30].

Хроматография в тонком слое

Хроматография в тонком слое анионообменника поли-(этиленимин)-целлюлозы используется для быстрого отделения дезоксирибонуклеотидов от рибонуклеотидов. Этот метод пригоден

для работы с небольшими количествами исследуемого материала (1 мкг или менее) [51, 55]; для разделения дезоксирибонуклеотидов и дезоксирибонуклеозидов [57] обычно используют целлюлозу [57]. Основания нуклеиновых кислот очень быстро и удобно разделять при помощи хроматографии в тонком слое целлюлозы [56].

Хроматография полинуклеотидов

Хроматография широко применяется для разделения и очистки полинуклеотидов. Методы, разработанные для определения РНК и ДНК, будут рассмотрены в следующих главах; подробное описание этих методов можно найти в соответствующих обзорах [32, 33]. При разработке методов хроматографирования были испытаны колонки из фосфата кальция [34—36], метилированного альбумина [37, 38], полиметакрилата магния (амберлит IRC-50) [39, 53] и катон-2 (катионный крахмал) [54]; наилучшие результаты были получены при использовании замещенных производных целлюлозы, например эктеола-целлюлозы (целлюлоза, обработанная эпихлоргидрином и триэтанолламином) [19, 23, 31, 40—42] или ДЭАЭ-целлюлозы (диэтиламиноэтилцеллюлоза) [43, 44]. При использовании таких колонок наиболее эффективное разделение олигонуклеотидов, содержащих от двух до семи нуклеотидов, достигается путем градиентной элюции мочевиной. С успехом применяются также колонки с сефадексом, обладающим свойством молекулярного сита [45]. Для очистки информационной РНК употребляют колонки из ДНК [46, 47, 48, 49] (стр. 234).

К методам, близким к хроматографии на колонках, относятся зонный электрофорез [20], электрофорез на крахмальном геле [40] и метод противоточного распределения [21, 33, 50].

Поглощение в ультрафиолете

Ценность всех описанных выше методов значительно повышается благодаря способности пуриновых и пиримидиновых производных интенсивно поглощать ультрафиолет в области 260—290 мкм. Это свойство, обусловленное наличием конъюгированных двойных связей, практически используется в нескольких направлениях:

1. Поглощение в ультрафиолете позволяет установить положение пятен пуриновых и пиримидиновых производных на бумажных хроматограммах и ионофореграммах. При облучении ультрафиолетом в области 250—290 мкм фильтровальная бумага дает голубую флуоресценцию. Пуриновые или пиримидиновые производные, поглощающие ультрафиолет, «гасят» тем самым флуоресценцию. Таким образом, пятно пуринового или пиримидинового

произв
свете
2.
циров
Водны
и нукл
рый с

Фиг. 5.

I — ад

(фиг. 5).

но опис

3. По

работки

чества п

ре при

фициент

4. По

нения ул

фотометр

Ульт

фиг. 6.

образцов

препарат

удобно

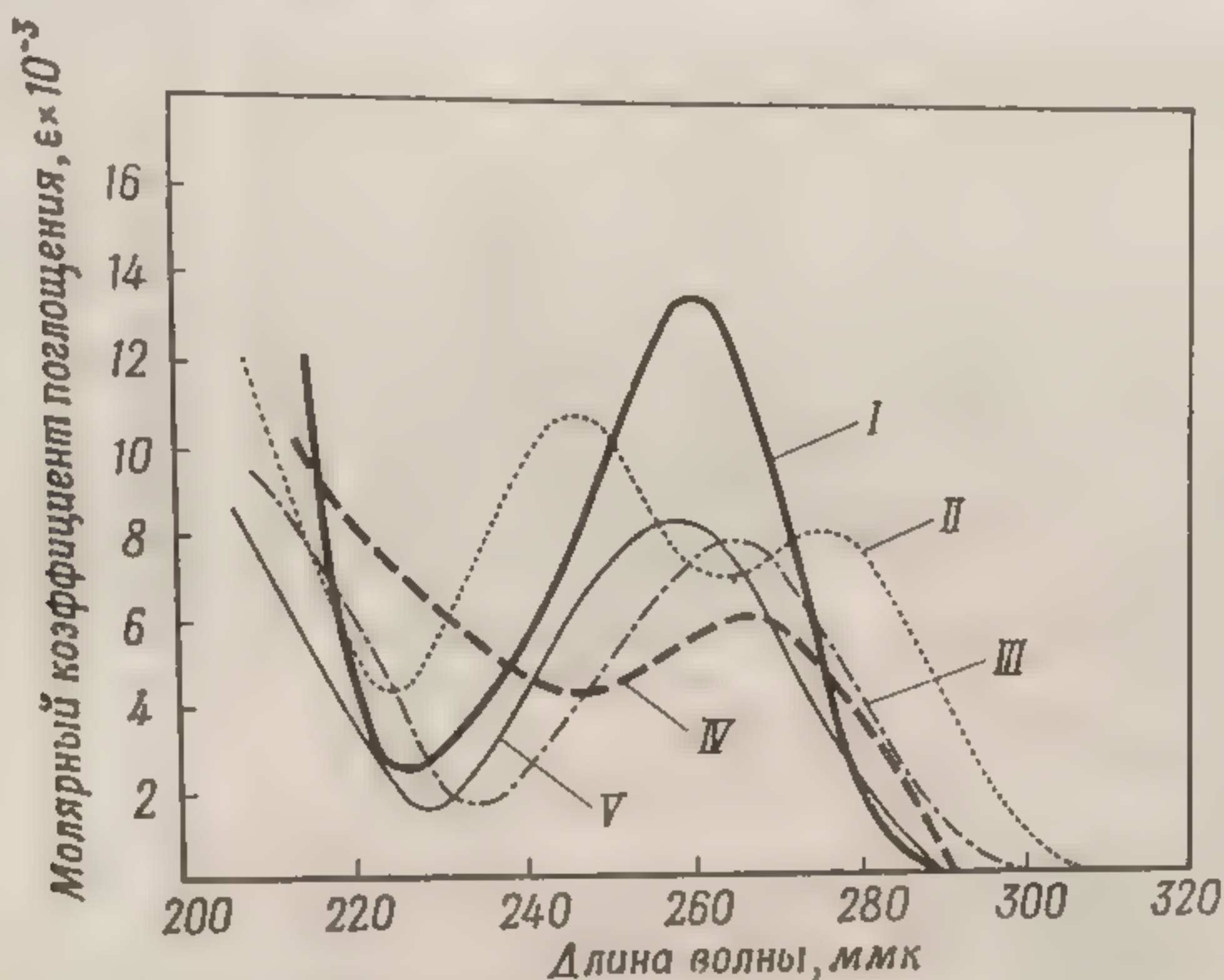
фосфора,

(log I⁰/I)

l — толщ

производного на бумаге, просматриваемой в ультрафиолетовом свете указанной длины волны, кажется темным.

2. Поглощение в ультрафиолете дает возможность идентифицировать различные пуриновые и пиримидиновые основания. Водный раствор каждого пуринового и пиримидинового основания и нуклеозида обладает определенным спектром поглощения, который специфически изменяется в зависимости от величины рН



Фиг. 5. Кривые поглощения в ультрафиолете пуриновых и пиримидиновых оснований при рН 7.

I — аденин; *II* — гуанин; *III* — тимин; *IV* — цитозин; *V* — урацил.

(фиг. 5). Спектры производных нуклеиновых кислот были подробно описаны в многочисленных статьях [24—26, 28].

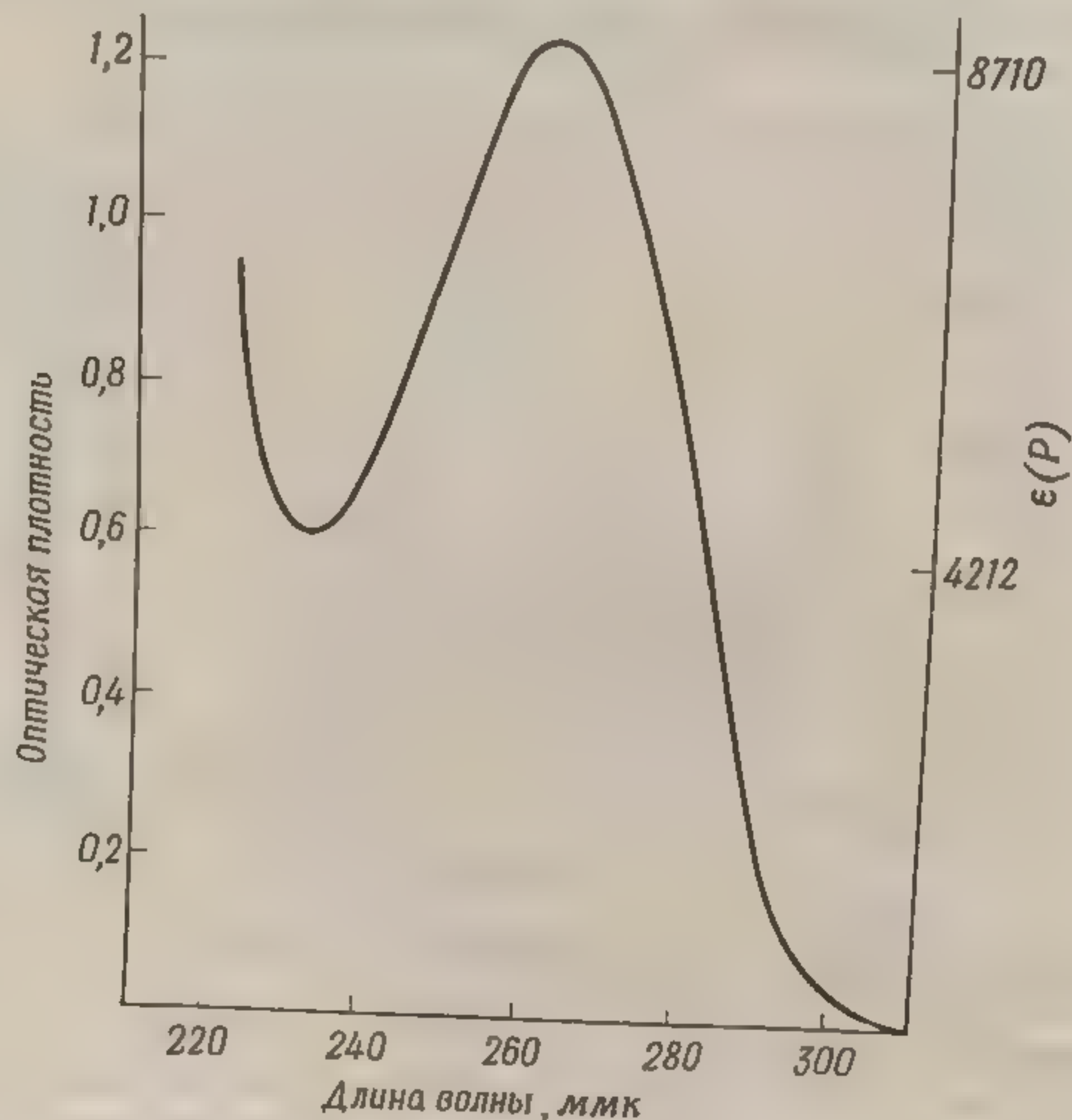
3. Поглощение в ультрафиолете было использовано для разработки микрометода, позволяющего определять небольшие количества пуриновых и пиримидиновых производных в чистом растворе при условии, что для каждого производного известны коэффициенты молярной экстинкции.

4. Поглощение в ультрафиолете служит основой для применения ультрафиолетовой фотографии и ультрафиолетовой спектрофотометрии (гл. VI).

Ультрафиолетовый спектр нуклеиновых кислот изображен на фиг. 6. Молекулярный вес нуклеиновых кислот исследуемых образцов трудно определить точно. Поэтому при сопоставлении препаратов из различных источников и с разной степенью очистки удобно пользоваться коэффициентом атомной экстинкции для фосфора, а именно $\epsilon(P) = 30 \cdot 98 E/cl$, где E — экстинкция $(\log I^0/I)$, c — концентрация фосфора в растворе в граммах на 1 л, l — толщина поглощающего слоя в сантиметрах [2]. Коэффициент

экстинкции нуклеиновых кислот примерно в 30—60 раз больше коэффициента экстинкции белков. Это свойство было использовано для фотографии в ультрафиолете и измерения поглощения в ультрафиолете (гл. VI).

Следует отметить, что коэффициент экстинкции нуклеиновой кислоты значительно возрастает при распаде или гидролизе,



Фиг. 6. Кривая поглощения в ультрафиолете раствора калийной соли дрожжевой РНК.

Видны максимум поглощения при 260 м.м.к и минимум при 230 м.м.к. Для данного образца РНК значения $\epsilon(P)$ при этих двух длинах волн составляют 8710 и 4212 соответственно.

поскольку сумма экстинкций входящих в ее состав нуклеотидов превышает экстинкцию полинуклеотида. Этот *гиперхромный эффект* обусловлен изменением резонансных свойств оснований при включении их в высокомолекулярный полинуклеотид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Caspersson T., Skand. Arch. Ohysiol., 73, Suppl. No. 8 (1936).
2. Chargaff E., Zamenhof S., J. Biol. Chem., 73, 327 (1948).
3. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., 176, 703, 715 (1948).
4. Chargaff E., Levine C., Green C., J. Biol. Chem., 175, 67 (1948).
5. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., 45, 216 (1949); *ibid.*, 46, 509 (1950); *ibid.*, 49, 401 (1951).

6. Cohn W. E., Methods in Enzymology (Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan), Vol. III, p. 724 (1957).
7. Cohn W. E., The Nucleic Acids (Ed. by E. Chargaff and J. N. Davidson), Vol. I, p. 211 (1955).
8. Marshak A., Vogel H. G., J. Biol. Chem., 189, 597 (1951).
9. Wyatt G. R., Biochem. J., 48, 584 (1951); The Nucleic Acids (Ed. by E. Chargaff and J. N. Davidson), Vol. 1, p. 243 (New York, Academic Press) (1955). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1957, стр. 443.)
10. Holiday E. R., Johnson E. A., Nature, 163, 216 (1949).
11. McNutt W. S., Biochem. J., 50, 384 (1952).
12. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Biochem. J., 52, 594 (1952).
13. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., 52, 552 (1952).
14. Edström J. E., Nature, 172, 809 (1953); Edström J. E., Hyden H., Nature, 174, 128 (1954); Edström J. E., Biochim. Biophys. Acta, 22, 378 (1956).
15. Hurlbert R. B., Schautz H., Brumm A. F., Potter V. R., J. Biol. Chem., 209, 23 (1954).
16. Bendich A., Methods in Enzymology (Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan), Vol. III, p. 715 (1957).
17. Markham R., Methods in Enzymology (Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan), Vol. III, p. 743 (1957).
18. Thomson R. Y., Chromatographic Techniques (Ed. by I. Smith), 2nd ed., London, Heinemann (1960).
19. Bradley D. F., Rich A., J. Amer. Chem. Soc., 78, 5898 (1956).
20. Pardee A. B., Paigen K., Prestidge L. S., Biochim. Biophys. Acta, 23, 162 (1957).
21. Holley R. W., Merrill S. H., Fed. Proc., 18, 249 (1959).
22. Brown G. L., Brown A. V., Symp. Soc. Exp. Biol., 12, 6 (1958).
23. Bendich A., Pahl H. B., Rosenkranz H. S., Rosoff M., Symp. Soc. Exp. Biol., 12, 31 (1958); J. Amer. Chem. Soc., 80, 3949 (1958).
24. Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A., The Nucleic Acids (Ed. by E. Chargaff and J. N. Davidson), Vol. I, p. 493 (1955).
25. Daly M. M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., J. gen. Physiol., 33, 497 (1950).
26. Volkin E., Cohn W. E., Methods of Biochemical Analysis (Ed. by D. Glick), Vol. I, p. 287, New York, Interscience Publishers, Inc. (1954).
27. Pabst Laboratories, Milwaukee, Wisconsin, Circular OR-10.
28. California Corporation for Biochemical Research, Catalogue of Biochemical Data (1958).
29. Tsuboi K. K., Price T. D., Arch. Biochem. Biophys., 81, 223 (1959).
30. Korn E. D., Biochim. Biophys. Acta, 32, 554 (1959).
31. Kondo N., Osawa S., Nature, 183, 1602 (1959).
32. Staehelin M., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 2, p. 170 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
33. Kirby K. S., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 3, p. 1 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1964).
34. Main R. K., Wilkins, Marjorie J., Cole L. J., J. Amer. Chem. Soc., 81, 6490 (1959).
35. Bernardi G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 6, 54 (1961).
36. Brown F., Newman J. F. E., Stewart D. L., Nature, 197, 590 (1963).
37. Sueoka N., Cheng T.-Y., J. Mol. Biol., 4, 161 (1962).
38. Sueoka N., Yamane T., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1454 (1962).
39. Frankel F. R., Crampton C. F., J. Biol. Chem., 237, 3200 (1962).
40. Goldthwait D. A., J. Biol. Chem., 234, 3245 (1959).
41. Levi A. A., Biochem. J., 69, 516 (1958).

42. Klouwen H. M., Weiffenbach H., J. Chromatog., 7, 45 (1962).
43. Kit S., Arch. Biochem. Biophys., 87, 318 (1960).
44. Tomlinson R. V., Tener G. M., J. Amer. Chem. Soc., 84, 2644 (1962).
45. Boman H. G., Hjerten S., Arch. Biochem. Biophys., Suppl., 1, 276 (1962).
46. Bautz E. K. F., Hall B. D., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 400 (1962).
47. Bolton E. T., McCarthy B. J., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1390 (1962).
48. Bolton E. T., McCarthy B. J., J. Mol. Biol., 8, 201 (1964).
49. McCarthy B. J., Bolton E. T., J. Mol. Biol., 8, 184 (1964).
50. Albertsson P.-A., Arch. Biochem. Biophys., Suppl., 1, 264 (1962).
51. Randerath K., Biochim. Biophys. Acta, 76, 622 (1963).
52. Edström J. E., Biochim. Biophys. Acta, 80, 399 (1964).
53. Mindich L., Hotchkiss R. D., Biochim. Biophys. Acta, 80, 73 and 93 (1964).
54. Smith K. C., Rebhun Stella, Kaplan H. S., Anat. Biochem., 1, 202 (1960).
55. Randerath K., J. Chromatog., 16, 111 and 126 (1964).
56. Holdgate D. P., Goodwin T. W., Biochim. Biophys. Acta, 91, 328 (1964).
57. Chmielewicz Z. F., Acara M., Anal. Biochem., 9, 94 (1964).
58. Edström J. E., Methods in Cell Physiology, Vol. 1, p. 417 (D. M. Prescott, Ed.), New York, Academic Press (1964).

Р
рибор
В
или Л
типов
1.
80%,
жится
котор
высок
стабил
2.
раств
РНК,
Эта Р
имеет
Каждо
Необхо
го мол
в качес
3. (с
вытайн
ваемую
волом
компле
матри
метабо
РНК
рые бу

РНК
му экст
При ви
использ

ГЛАВА IV

ВЫДЕЛЕНИЕ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА РНК

Типы РНК

РНК представляет собой полимер, состоящий из мономеров — рибонуклеозидмонофосфатов.

В живой клетке — будь то клетка млекопитающих, бактерий или любых других организмов — содержится РНК трех основных типов:

1. Основная часть РНК, на долю которой приходится около 80%, — это *рибосомная РНК (r-РНК)*. Рибосомная РНК содержится в мельчайших цитоплазматических частицах — рибосомах, которые рассматриваются в гл. VIII. *r-РНК* характеризуется высоким молекулярным весом ($0,5-2,0 \cdot 10^6$) и метаболической стабильностью.

2. Следующим по содержанию (около 15%) типом является *растворимая РНК (s-РНК)*, называемая также *транспортной РНК, РНК-переносчиком, акцепторной* или *адапторной РНК*. Эта РНК осуществляет перенос аминокислот (гл. XIII). *s-РНК* имеет значительно меньший молекулярный вес (около 25 000). Каждой аминокислоте соответствует своя специфическая *s-РНК*. Необходимо отметить, что не всякая растворимая РНК указанного молекулярного веса действительно может функционировать в качестве акцептора или переносчика аминокислот [99].

3. Остальные 5% или менее приходятся на долю РНК, чрезвычайно близкой к ДНК по составу оснований. Эту РНК, называемую *информационной РНК (m-РНК)*, иногда обозначают символом Д-РНК. Ее называют также *РНК-посредником (messenger)*, *комплементарной, трансляционной, транскрибирующей* или *матричной РНК*; *m-РНК* будет рассмотрена в гл. XII. Эта РНК метаболически относительно активна.

РНК некоторых вирусов обладает особыми свойствами, которые будут рассмотрены в ходе дальнейшего изложения.

Выделение РНК

РНК в клетке связана с белком в виде нуклеопротеида. Поэтому экстрагировать ее в неразрушенном состоянии довольно трудно. При выборе метода экстрагирования следует учитывать тип используемой ткани. При работе с животными тканями, например

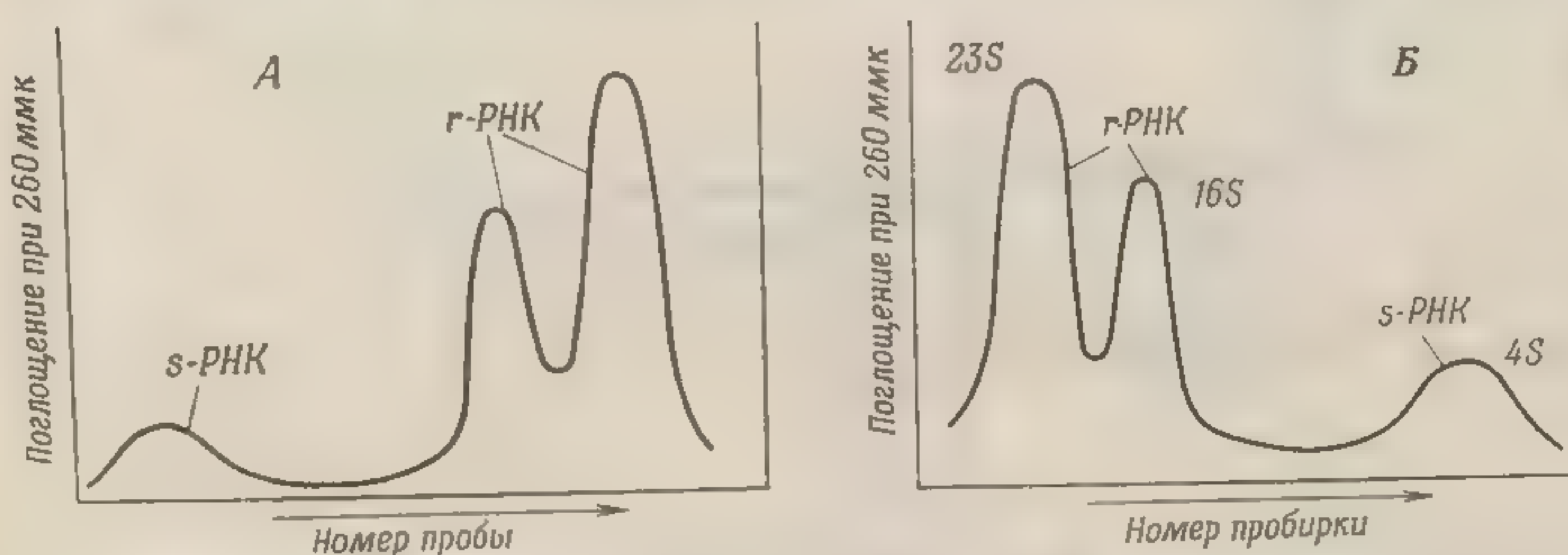
с печенью, в ряде случаев удобно предварительно отделить цитоплазму от ядер и использовать только цитоплазму. Это можно осуществить путем экстрагирования гомогенизированной ткани 0,14 М раствором NaCl, приводящего к отделению цитоплазматических рибонуклеопротеидов от содержащего ДНК ядерного материала. Рибонуклеопротеид осаждают затем из экстракта при pH 4,5 и вновь растворяют его в растворе бикарбоната натрия. Продолжительное встряхивание с несколькими последовательно сменяемыми порциями хлороформа, содержащего небольшое количество октилового спирта, приводит к удалению белка; нуклеиновую кислоту, остающуюся в водном растворе, осаждают в виде натриевой соли при добавлении спирта. Можно поступить и иначе: вызвать спиртом денатурацию рибонуклеопротеида и экстрагировать нуклеиновую кислоту 10%-ным раствором хлористого натрия, из которого затем осадить ее добавлением двух объемов спирта [1—4]. Примерно аналогичный метод существует и для выделения РНК из животных тканей [5]. В этом случае нуклеиновую кислоту осаждают из раствора солянокислого гуанидина, в котором белок нерастворим; для удаления белка можно использовать также додецилсульфат натрия [6, 7].

Пожалуй, чаще всего для получения больших количеств неразрушенной РНК применяют метод, основанный на обработке материала водным фенолом, который осаждает белок и ДНК. Водный слой, получаемый при центрифугировании, содержит РНК и полисахариды. Оба эти соединения осаждаются этанолом, но РНК может быть экстрагирована из осадка 2-метоксиэтанолом в фосфатном буфере. После диализа РНК осаждается этанолом. Различные модификации фенольного метода [98] подробно обсуждаются в работе Кирби [8].

Описанными выше методами из клеток можно экстрагировать достаточно большое количество РНК и фракционировать ее затем хроматографическими или другими методами. Однако в ряде случаев удобнее фракционировать клеточный материал, прежде чем будет экстрагирована РНК. Методом, описанным в гл. VIII, можно выделить из клеток рибосомы и использовать их для получения *r*-РНК [9]. Растворимая РНК (*s*-РНК) содержится в растворимой цитоплазматической фракции клеток (отсюда ее название), которую получают при центрифугировании гомогената ткани с целью удаления ядер, митохондрий, микросом и рибосом. Эта фракция может содержать также небольшое количество *m*-РНК или разрушенной *r*-РНК. Для получения *s*-РНК указанную фракцию используют либо непосредственно, либо после добавления кислоты до pH 5,4—5,0. В последнем случае образуется так называемый «pH5-осадок», из которого *s*-РНК экстрагируется фенолом (стр. 267).

Очистка РНК

РНК, полученная одним из упомянутых выше методов, представляет собой сложную смесь полинуклеотидов с цепями различной длины и продуктов их распада, или олигонуклеотидов. (Олигонуклеотидами считают обычно небольшие полинуклеотиды, содержащие от 2 до 7 нуклеотидных единиц.) Часто возникает необходимость в дальнейшем фракционировании этой сложной



Фиг. 7. Разделение двух рибосомных РНК и s-РНК *E. coli*.

А. Разделение на колонке из метилированного альбумина.

Б. Разделение тех же РНК путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы и сбора проб в пробирки, как указано в подписи к фиг. 8.

смеси. Иногда к полученному раствору добавляют бентонит, с тем чтобы предотвратить разложение полинуклеотидов нуклеазами в процессе очистки [9, 89, 90].

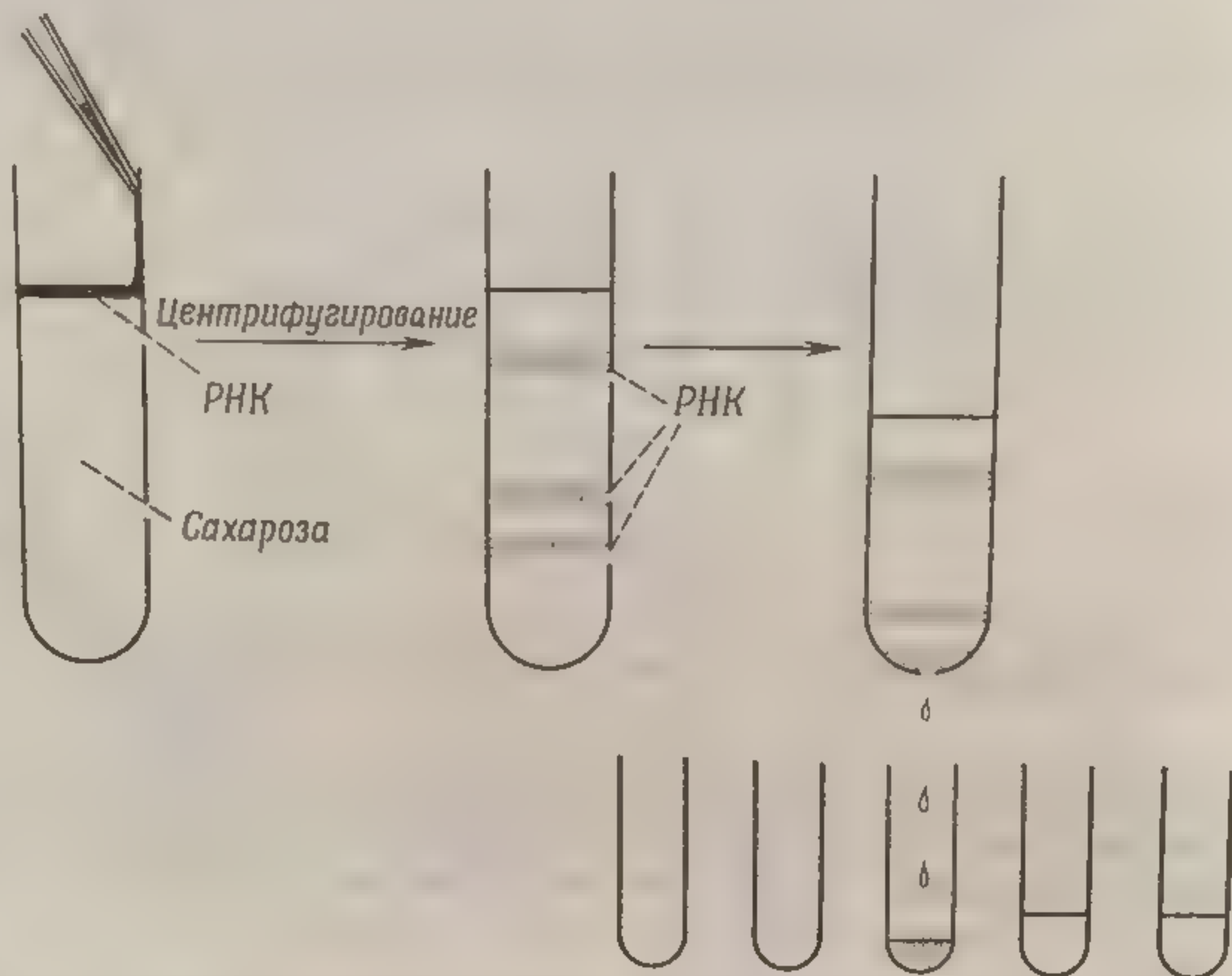
Очистку РНК можно производить различными методами, в том числе хроматографией на колонке, противоточным распределением и градиентным центрифугированием.

Существует много различных систем для хроматографического разделения смесей РНК. К ним относятся колонки из фосфата кальция [10], замещенных целлюлоз (ДЭАЭ или эктеола) [11, 12], полиакриламида и сефадекса [13]. Одной из наиболее удобных является колонка из метилированного альбумина, нанесенного на кизельгур [14—16], с которой после элюции возрастающими концентрациями хлористого натрия удается получить 3 пика РНК. Один из этих пиков соответствует s-РНК, два других — r-РНК (фиг. 7).

Три основные фракции РНК можно легко разделить путем градиентного центрифугирования в растворе сахарозы [17]. Пробирки ультрацентрифуги наполняют раствором сахарозы возрастающих концентраций — от 5% наверху до 20% внизу. Раствор РНК осторожно наносят сверху и центрифугируют с большой скоростью в течение нескольких часов. Затем дно пробирки про-

калывают иглой для подкожных инъекций и через полученное отверстие отбирают ряд проб примерно по 10 капель в каждой. Содержание нуклеиновой кислоты в каждой пробе определяют, измеряя поглощение в ультрафиолете (фиг. 8).

Константы седиментации РНК, полученной таким путем из *Escherichia coli*, составляют 4S, 16S и 23S. РНК с константой



Фиг. 8. Разделение различных РНК при помощи центрифугирования в градиенте сахарозы.

После центрифугирования две полосы тяжелой рибосомной РНК оседают вблизи дна пробирки, тогда как более легкая *s*-РНК остается ближе к поверхности раствора. После прокола дна пробирки РНК из различных слоев собирают в ряд пробирок и измеряют поглощение каждой пробы РНК при 260 мк. Полученные результаты изображают графически, как показано на фиг. 7, Б.

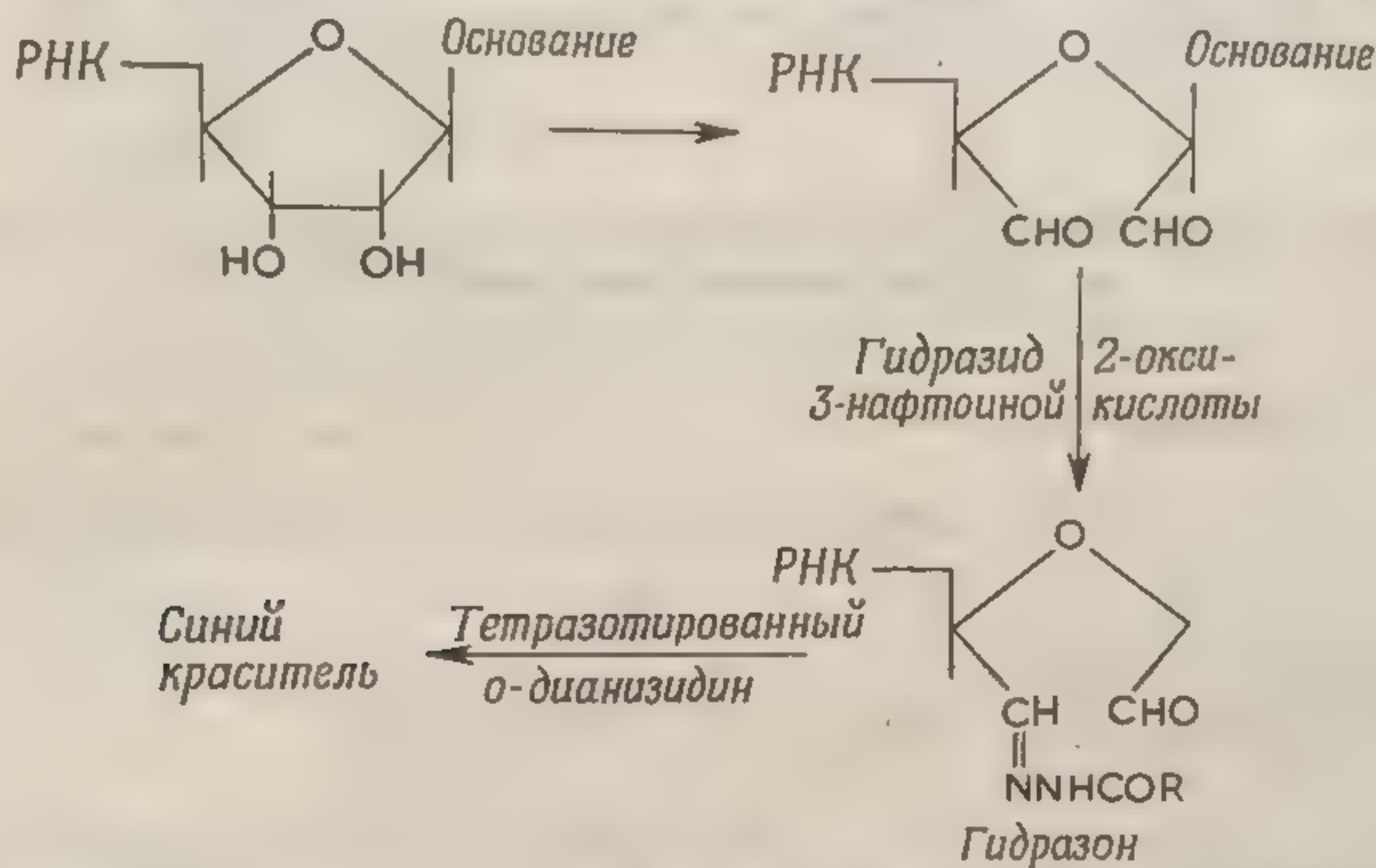
седиментации 4S соответствует *s*-РНК с молекулярным весом около 25 000, т. е. в ее состав входят около 70 нуклеотидов. РНК с константами седиментации 16S и 23S имеют молекулярный вес $5,6 \cdot 10^5$ и $1,12 \cdot 10^6$ и происходят соответственно из рибосом с константами седиментации 30S и 50S [65] (стр. 133). РНК из тканей млекопитающих дают пик с константой седиментации 4S, что соответствует *s*-РНК, и два пика *r*-РНК с константой седиментации 18—22S и 28—34S.

Применение градиентного центрифугирования и колонок из ДНК-агара для обнаружения и выделения *m*-РНК описано в гл. XII.

Метод противоточного распределения широко используется для разделения различных фракций *s*-РНК [8, 18, 20, 21]. Например,

при помощи системы фосфатный буфер — формамид — изопропанол можно успешно выделить из дрожжей фракции *s*-РНК, акцептирующие аланин, валин, гистидин и тирозин [19].

Выделение одной определенной специфической *s*-РНК из общей смеси РНК можно с успехом осуществить при помощи химических методов. Замечник и его сотрудники [22—24] экстрагировали *s*-РНК из дрожжей и удаляли все связанные с ней аминокислоты инкубацией при pH 10. Затем при помощи фракции фермента,



Фиг. 9. Предложенный Замечником метод образования окрашенных производных *s*-РНК, не связанных с аминокислотным остатком (см. текст) [22—24].

активирующего аминокислоты, смесь метили C^{14} -валином. Последний присоединялся к гидроксильной группе концевой нуклеозида в положении 3' (или 2'). Далее *s*-РНК, не содержащую валинового остатка, окисляли периодатом, что приводило к превращению неэтерифицированных 2'- или 3'-*цис*-гидроксильных групп концевого нуклеозида в диальдегидные. Дальнейшая обработка гидразидом 2-окси-3-нафтоиной кислоты вызывала образование гидразона, который при соединении с тетразо-*о*-дианизидином давал синий краситель (фиг. 9). Этот краситель отделяли от валинспецифической *s*-РНК при помощи распределения в смеси фосфатного буфера с *n*-пропанолом или хроматографическим фракционированием на ДЭАЭ-сефадексе. Таким путем был получен препарат валин-специфической *s*-РНК 90%-ной чистоты.

Молярное соотношение оснований

Прежде считали, что молекула нуклеиновой кислоты содержит эквимоллярные количества входящих в ее состав четырех оснований, связанных между собой в виде нуклеотидов с образованием

тетрануклеотидной структуры. И только в 1950 г. тетрануклеотидная гипотеза была окончательно отброшена в результате точного хроматографического анализа (табл. 1), произведенного Чаргаффом и его сотрудниками, а также Маркхэмом, Смитом, Уайттом. Эти исследователи ясно показали, что молярные соотношения оснований в нуклеиновых кислотах значительно варьируют в зависимости от источника их получения [25]. Методы определения молярных соотношений оснований при помощи гидролиза и хроматографии подробно рассмотрены Бендичем [26].

Т а б л и ц а 1

Молярные соотношения оснований (в молях на 100 моль нуклеотидов) в РНК из разных источников [27]

Источник РНК	Аденин	Гуанин	Цитозин	Урацил
Печень быка	17,1	27,3	33,9	21,7
Почка быка	19,7	26,7	33,4	20,2
Почка крысы	19,4	29,5	30,7	20,4
Зародыш морского ежа (<i>Paracentrotus</i>)	22,6	29,4	27,2	20,8
Дрожжи	25,4	24,6	22,6	27,4
<i>Serratia marcescens</i>	20,3	31,2	24,3	24,1
<i>Escherichia coli</i>	25,3	28,8	24,7	21,2
<i>Mycobacterium phlei</i>	20,9	30,8	27,1	21,3

Относительные величины молярных соотношений оснований в РНК из различных источников, приведенные в табл. 1, значительно варьируют. Эльсон и Чаргафф [27] впервые установили, что число нуклеотидов, содержащих 6-аминогруппу (в аденине и цитозине), в общем, как правило, равно числу нуклеотидов, имеющих 6-кето-группу (в гуанине и урациле).

Содержание псевдоуридина (ψУ) и метилированных оснований, так называемых «минорных оснований» РНК, особенно высоко во фракции s-РНК (табл. 2 и 3). Различия в относительном содержании оснований разных фракций РНК из клеток одного типа показаны также в табл. 3 на примере s-РНК, r-РНК и m-РНК *E. coli*. В некоторых РНК, например в РНК реовируса и вируса раневой опухоли (а также в s-РНК), обнаружена строгая эквивалентность между содержанием аденина и урацила, а также между содержанием цитидина и гуанина (табл. 4). Значение этих соотношений для образования двуспиральной структуры обсуждается на стр. 56.

Таблица 2

Относительные количества минорных оснований
в РНК печени крыс, в молях на 100 моль
уридина [44]

Минорное основание	Рибо- сомная РНК	Раство- римая РНК
Псевдоуридин	7,5	25
5-метилцитозин	0,4	10
6-метиламинопури	0,5	8,1
6-диметиламинопури	0,1	0,1
1-метилгуанин	0,1	3,3
2-метиламино-6-оксипури	0,1	2,3
2-диметиламино-6-оксипури	0,1	3,0

Таблица 3

Молярные соотношения оснований в РНК различных клеточных фракций

РНК	Аде- нин	Гуа- нин	Цито- зин	Ура- цил	Псевдо- уридин	Метили- рован- ные ос- нования	Лите- ратура
s-РНК дрожжей	19,4	26,6	25,1	20,1	4,6	3,1	[28]
s-РНК печени крысы	16,6	31,1	27,8	15,9	4,3	3,5	[28]
s-РНК <i>E. coli</i>	18,3	30,3	30,3	15,9	2,4	2,2	[28]
s-РНК <i>E. coli</i>	20,3	32,1	28,9	15,0	2,1	1,6	[29]
r-РНК <i>E. coli</i>	25,2	31,5	21,6	21,7	—	—	[30]
m-РНК <i>E. coli</i>	25,1	27,1	24,1	23,7	—	—	[31]

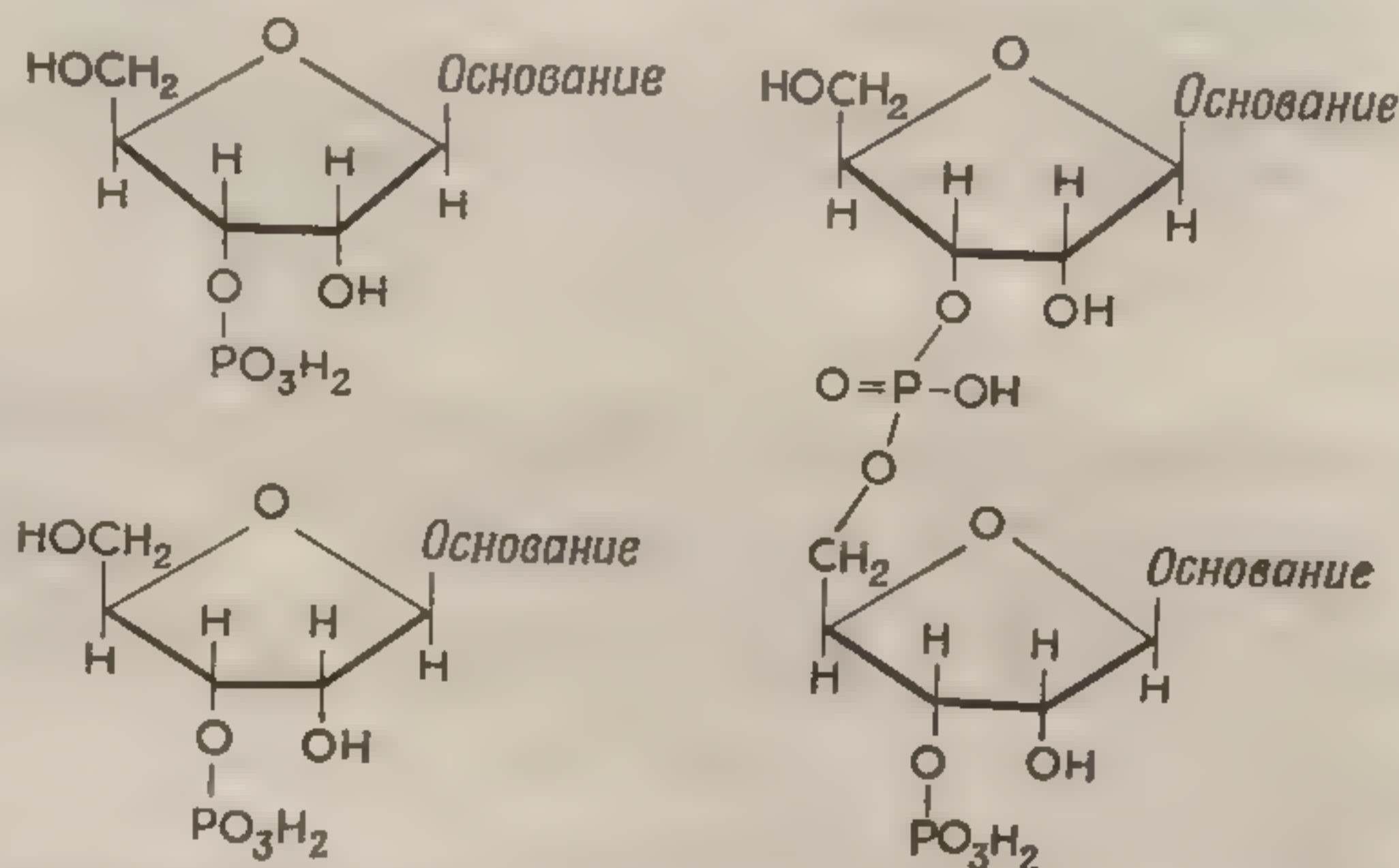
Таблица 4

Молярные соотношения оснований в РНК некоторых вирусов

Вирус	Аденин	Гуанин	Цитозин	Урацил	Литера- тура
Вирус мозаики табака	29,8	25,4	18,5	26,3	[32]
Вирус желтой мозаики турнепса	22,6	17,2	38,0	22,2	[33]
Вирус полиомиелита	28,6	24,0	22,0	25,4	[34]
Вирус энцефаломиокардита	27,3	23,5	23,2	25,9	[35]
мышь	28,0	22,3	22,0	27,9	[36]
Реовирус, тип 3	31,1	18,6	19,1	31,3	[36]
Вирус раневой опухоли					

Строение РНК

Строение РНК подробно обсуждается в обзорах Маркхэма [45] и других авторов. Приступая к этому вопросу, необходимо прежде всего рассмотреть природу межнуклеотидной связи. Распад РНК в щелочной среде приводит к нейтрализации щелочи. Отсюда следует, что часть или все группы фосфорной кислоты участвуют в межнуклеотидных связях. Аминогруппы в построении этих связей участия не принимают, так как интактная нуклеиновая кислота дезаминируется под действием азотистой кислоты.



Фиг. 10. Образование динуклеотида, имеющего связь $(C-3')-O-P-O-(C-5')$.

Не участвуют в межнуклеотидных связях, по-видимому, и гидроксильные группы, поскольку, по данным электрометрического титрования, эти группы не замещены. Уже в ранней работе Гулланда и Джексона было высказано предположение, что межнуклеотидные связи расположены при $C-5'$. Это подтвердили Кон и Волкин [37], которые при обработке РНК диэстеразой змеиного яда получили смесь 5'-фосфатов всех 4 нуклеозидов и хроматографически их разделили.

Наряду с этим известно, что разрушение РНК щелочью приводит, как это описано ниже, к образованию смеси нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфатов. Весьма вероятно, таким образом, что основные межнуклеотидные связи представлены фосфоэфирными группами, соединяющими $C-5'$ одного нуклеотида с $C-2'$ или $C-3'$ следующего нуклеотида. На фиг. 10 изображен динуклеотид, содержащий связь $(C-3')-O-P-O-(C-5')$.

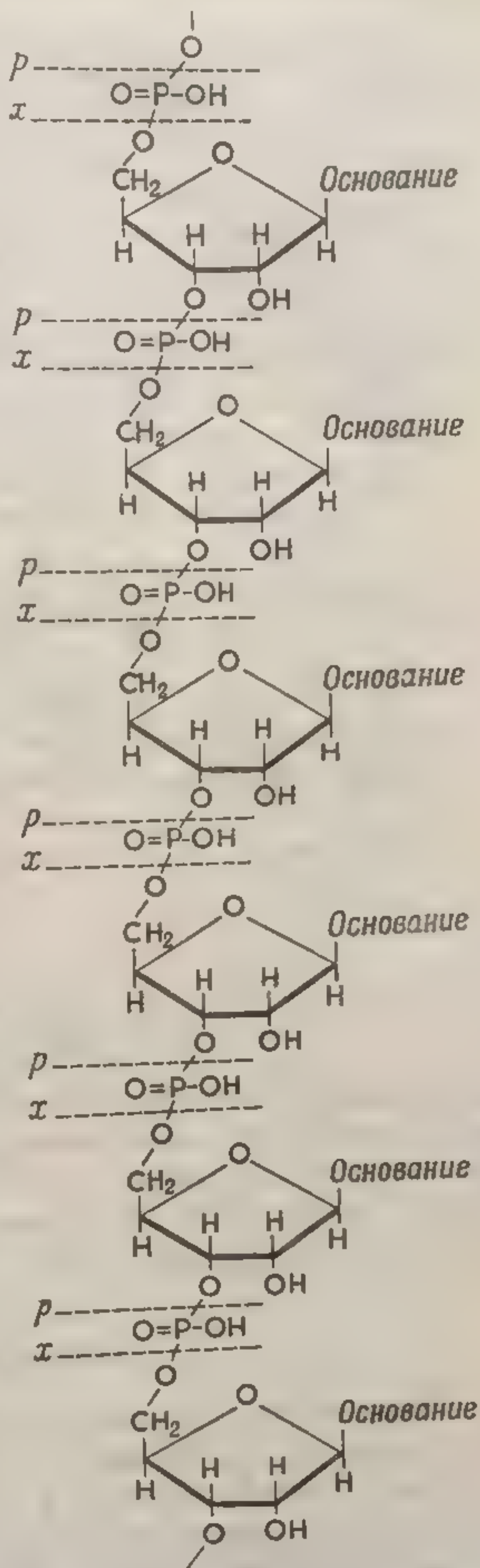
Гидролиз РНК диэстеразой селезенки приводит к образованию нуклеозид-3'-фосфатов [38]. Следовательно, межнуклеотидная связь имеет характер $(C-3')-(C-5')$, а не $(C-2')-(C-5')$. Ферментативное разрушение РНК подробно рассматривается в гл. VI.

Часть полинуклеотидной цепи подобного строения изображена на фиг. 11. Теоретически возможно наличие боковой цепи такого же строения, присоединенной либо к С-2', либо к трижды этерифицированным фосфатным группам. Однако, по общему мнению, разветвленные полинуклеотидные цепи вообще отсутствуют [39].

Разрушение щелочью

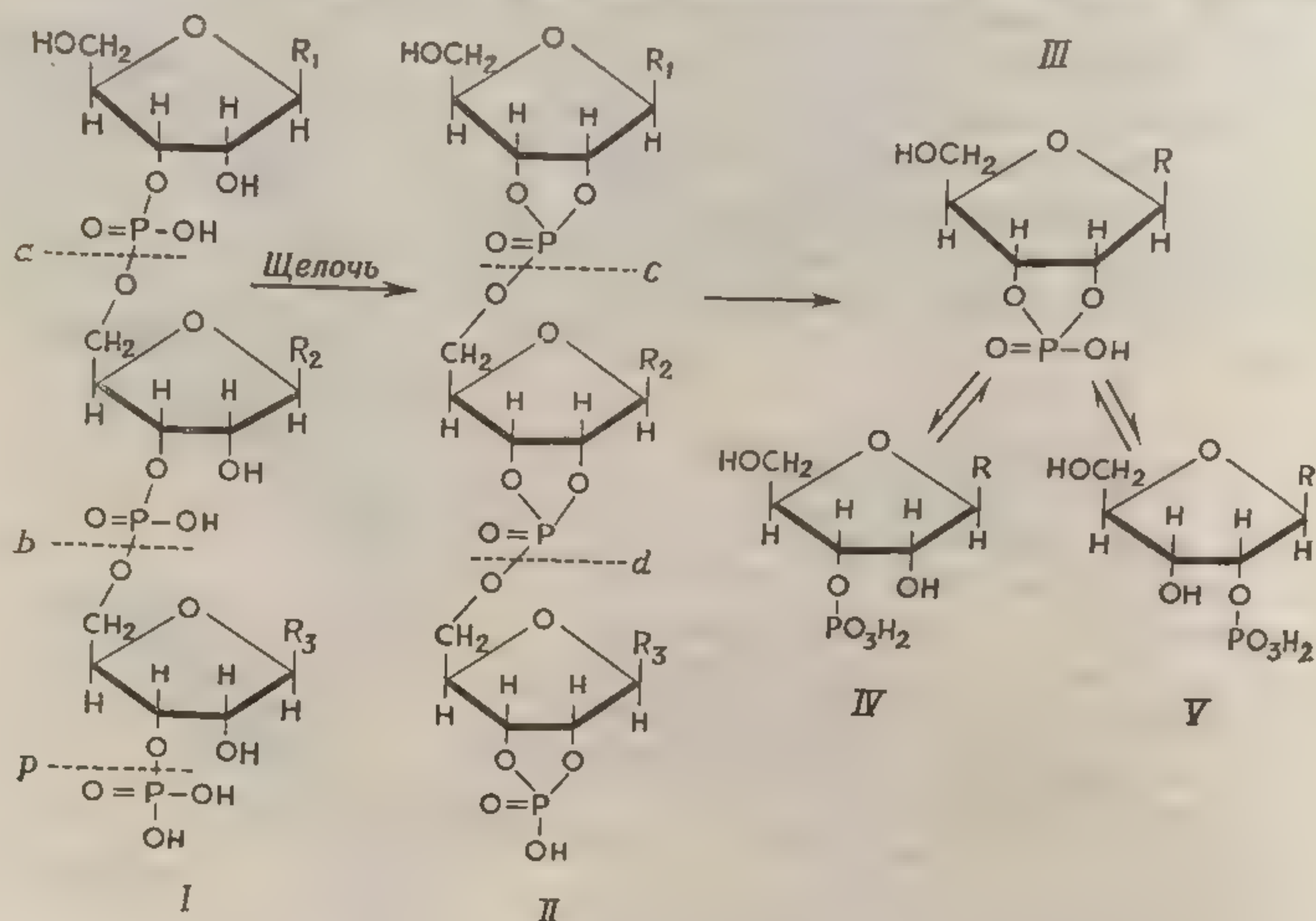
Механизм распада РНК в щелочной среде был выяснен Тоддом и его сотрудниками [40, 41], показавшими, что щелочной гидролиз приводит к образованию двух изомерных форм каждого нуклеотида. Первоначально эти изомеры именовались нуклеотидами *a* и *b*, но впоследствии они оказались соответственно нуклеозид-2 и нуклеозид-3'-фосфатами [42, 43]. В кислой среде каждый изомер легко превращался во второй, что приводит к образованию смеси двух изомеров, но в щелочной среде они оставались стабильными без взаимопревращения. В ходе взаимопревращений образуется циклическое промежуточное соединение — нуклеозид-2',3'-фосфат (фиг. 12, III), которое дает при гидролизе смесь 2'- и 3'-фосфатов. Например, тринуклеотид I (фиг. 12) образует циклический промежуточный продукт II.

В дальнейшем это соединение II распадается в результате легкого разрушения триэфирных групп исключительно по связям $P-O-(C-5')$ (на рисунке показаны буквами *c* и *d*) с образованием циклических нуклеозид-2',3'-фосфатов (III). Из последних получается смесь нуклеозид-2' и 3'-фосфатов (IV и V).



Фиг. 11. Участок полинуклеотидной цепи в молекуле РНК. Гидролиз в щелочной среде или диэстеразой селезенки вызывает разрыв связей, обозначенных буквой *x*. При гидролизе диэстеразой змеиного яда разрываются связи, обозначенные буквой *p*.

Аналогично этому обработка щелочью полинуклеотида, изображенного на фиг. 11, должна вызывать его гидролиз до смеси



Фиг. 12. Щелочной гидролиз тринуклеотида.
R — пуриновое или пиримидиновое основание.

нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфатов в результате разрыва связи x после описанной выше циклизации. Вместе с тем под действием фосфодиэстеразы змеиного яда в результате разрыва связей (C-3') — O — P в положении, отмеченном буквой p , образуются нуклеозид-5'-фосфаты (см. гл. V).

Схематическое обозначение

Изображение полинуклеотидных цепей формулой, представленной на фиг. 11, слишком громоздко. Поэтому обычно пользуются схемой, приведенной на фиг. 13, Б. Вертикальная линия соответствует углеродной цепи сахара, к которой при C-1' присоединены основания. Пересечение вертикальной линии диагональной указывает положение фосфатной связи при C-3', а конец диагональной линии, наиболее удаленный от основания, указывает положение фосфатной связи при C-5'. При помощи такой схемы можно изобразить строение ДНК и РНК.

Хишпель, Ортид и Очоа [46] предложили систему, упрощающую символическое изображение. По их системе фосфатная группа обозначается буквой ϕ . Если знак расположен справа от сим-

вола 1
C-3' р
нукле
симво
моноэт
ной фо
и C-3'
динукл
Для
леотид

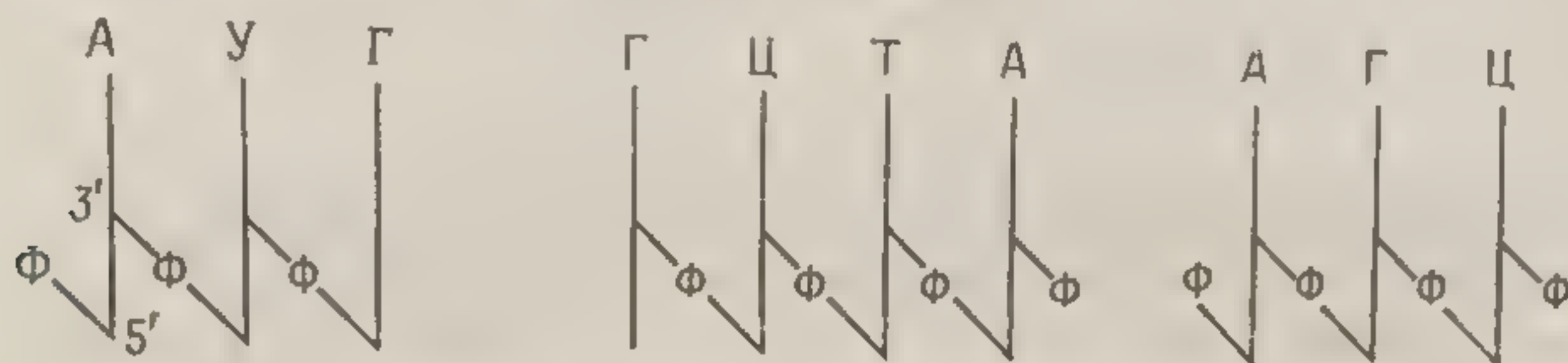
Бук
гуаноз
рибону
ветству
шут бу

Ном
циклич
ка еще
Для п
фосфор
зуют л
либо в
Так, У
значаю
а УфУ-
ответс
лическ

Сис
клатур
нуклео
стр.
бюллет
ванног
нальн
кладно
издате
Основ
щие
привед
4 Дж.

вола нуклеозида, это означает, что фосфат этерифицирован по С-3' рибозного остатка. Если же буква ф стоит слева от символа нуклеозида, то фосфат этерифицирован по С-5' рибозы. Так, символ УфУф соответствует динуклеотиду с одним фосфатом, моноэтерифицированным по С-3' уридинового остатка, и диэфирной фосфорной связью между С-5' этого же уридинового остатка и С-3' другой уридиновой группы. Формула УфУ соответствует динуклеозидмонофосфату, а именно уридин-3'-уридин-5'-фосфату.

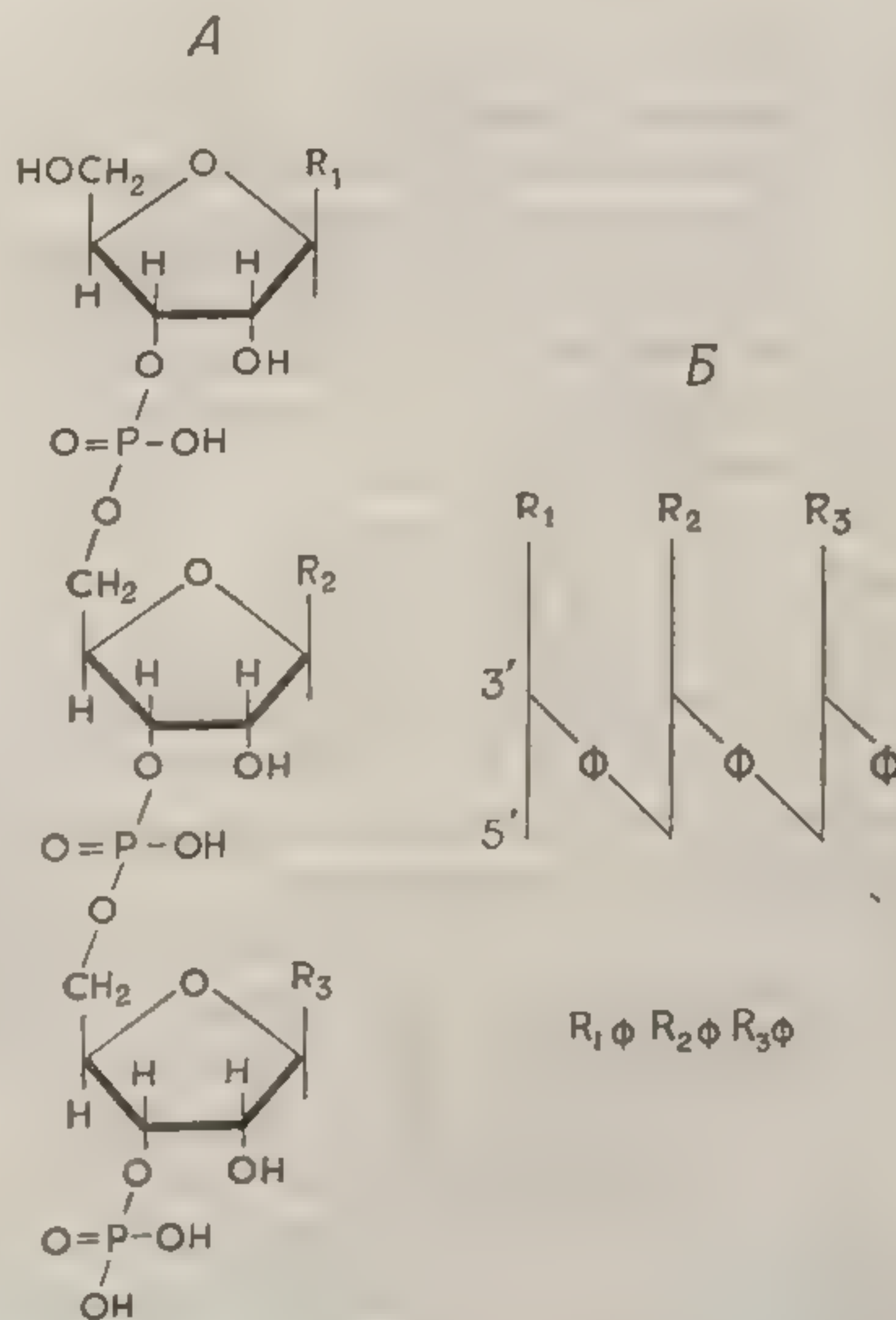
Для иллюстрации описанного метода изображения полинуклеотидов приведем несколько примеров:



Буквы А, Г, Ц, У и Т обозначают соответственно аденозин, гуанозин, цитозин, уридин и тимидин. Для обозначения дезоксирибонуклеозида перед соответствующим символом пишут букву д (например, дА).

Номенклатура концевых циклических нуклеотидов пока еще не унифицирована. Для изображения их 2',3'-фосфорильных групп используют либо символ «цикло-ф-», либо восклицательный знак. Так, У-цикло-ф или У! обозначают уридин-2',3'-фосфат, а УфУ-цикло-ф или УфУ! соответствуют концевому циклическому динуклеотиду.

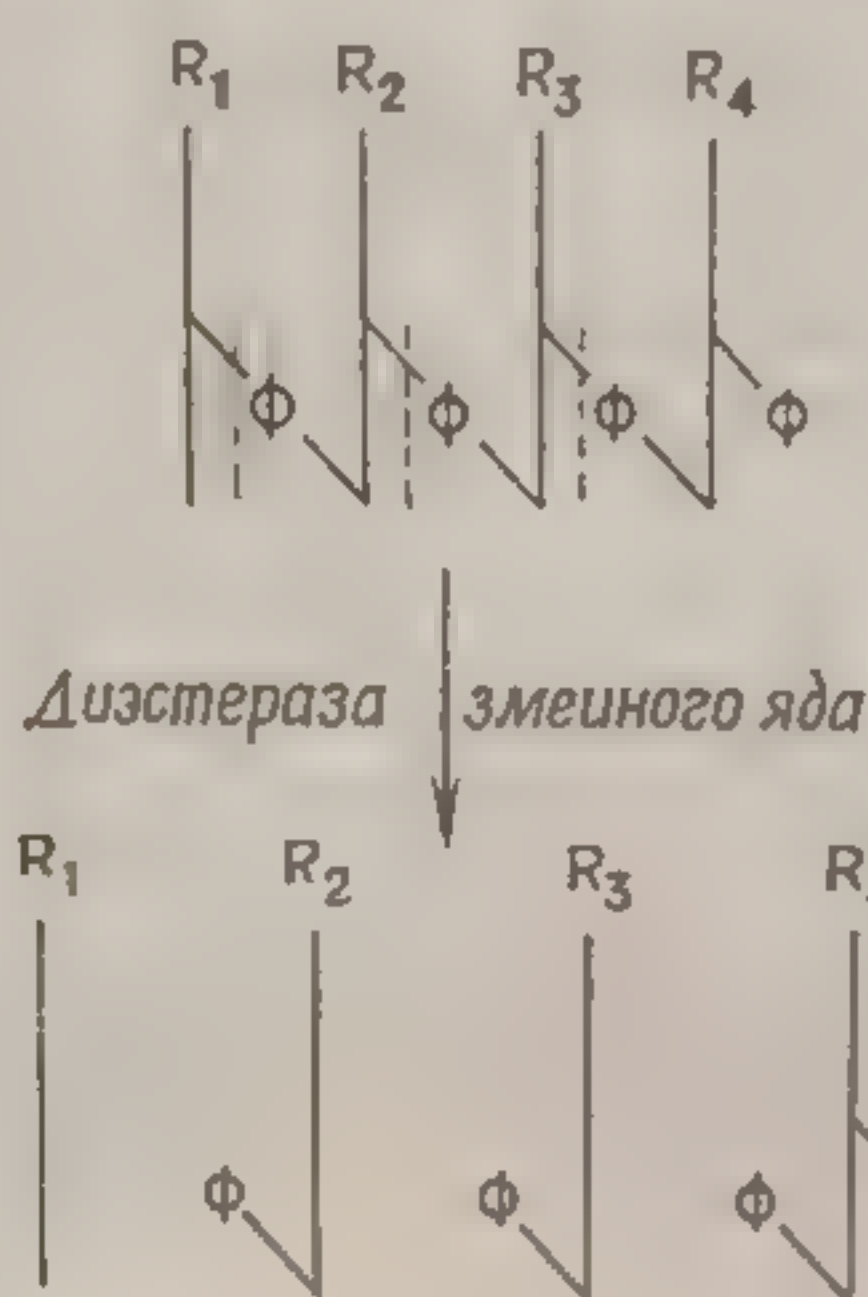
Систематическая номенклатура нуклеотидов и полинуклеотидов обсуждается на стр. 71 Информационного бюллетеня № 13, опубликованного в 1961 г. Международным союзом чистой и прикладной химии (Лондон, издательство Butterworths). Основные сведения, касающиеся этой номенклатуры, приведены на стр. 9, 10.



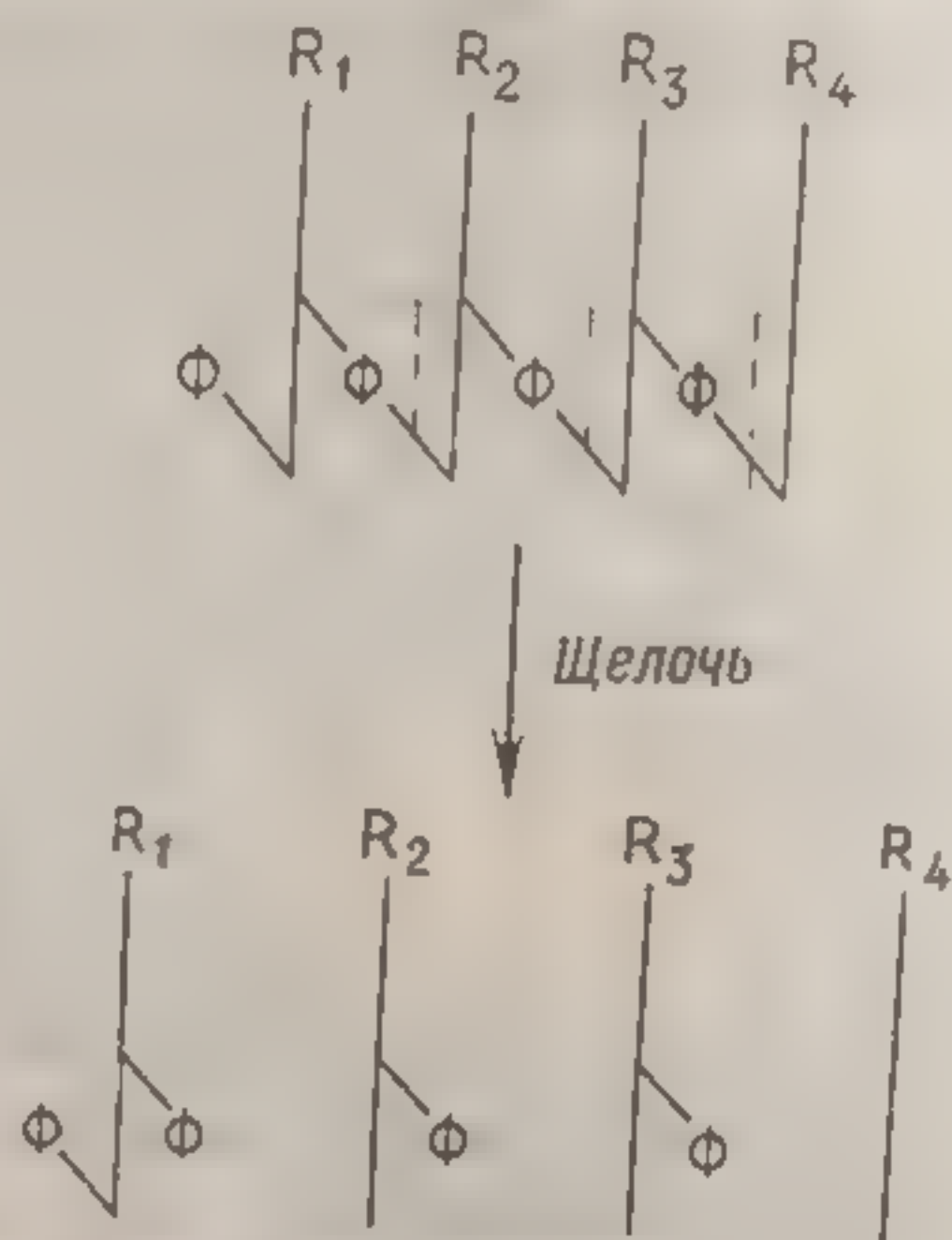
Фиг. 13. Тринуклеотид, содержащий основания R_1 , R_2 и R_3 . Показаны развернутая (А) и сокращенная (Б) формулы.

Концевые группы и последовательность нуклеотидов

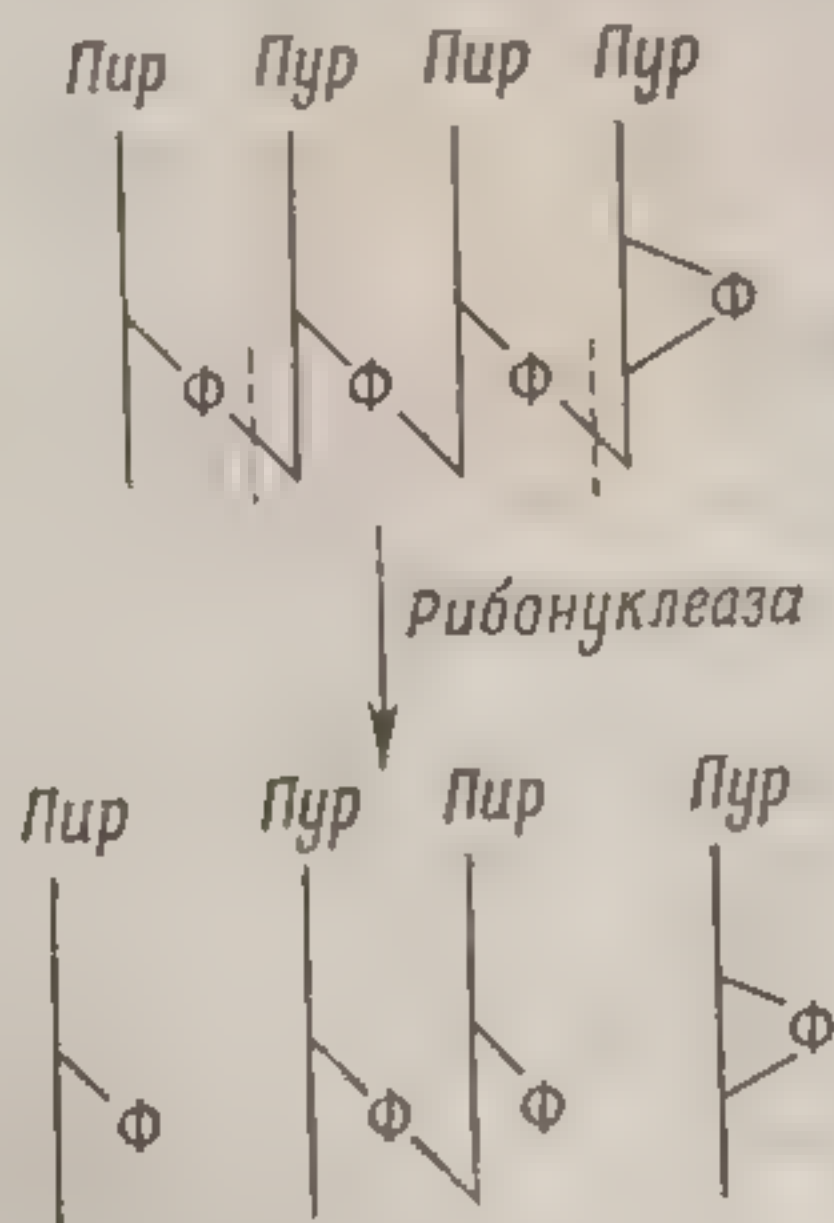
Для иллюстрации общих методов выяснения природы концевых групп в полинуклеотидных цепях приведем несколько простых примеров. Используя очищенную фосфодиэстеразу из



Фиг. 14. Разрушение тетрануклеотида диэстеразой змеиного яда с образованием нуклеозида, содержащего основание R_1 , нуклеозид-5'-монофосфатов, содержащих основания R_2 и R_3 , и нуклеозид-3', 5'-дифосфата, содержащего основание R_4 .



Фиг. 15. Щелочной гидролиз тетрануклеотида с образованием нуклеозид-3', 5'-дифосфата, содержащего основание R_1 , двух нуклеозид-3'-монофосфатов, содержащих основания R_2 и R_3 , и нуклеозида, содержащего основание R_4 .



Фиг. 16. Гидролиз тетрануклеотида рибонуклеазой с образованием пиримидин-нуклеозид-3'-фосфата, динуклеотида и пуридиннуклеозид-2',3'-циклического монофосфата.

змеиного яда, Кон и Волкин [37] обнаружили, что продукты гидролиза РНК состоят преимущественно из нуклеозид-5'-фосфатов, но содержат также пуридиннуклеозид- и пиримидиннуклеозиддифос-

фаты. Если (а это, по-видимому, так и есть) на левом конце цепи, изображенной на фиг. 14, находится остаток пуриннуклеотида (R_1), а на правом конце — остаток пиримидиннуклеотида (R_4), тогда гидролиз, вызванный диэстеразой змеиного яда, т. е. разрыв связи С-3— фосфат, должен привести к образованию пуриннуклеотида из левой концевой группы и пиримидиннуклеозид-3,5'-дифосфата из правой концевой группы.

Подобно этому в результате щелочного гидролиза тетрануклеотида, изображенного на фиг. 15, образуется нуклеозид, содержащий R_4 с правого конца цепи. При помощи хроматографии этот нуклеозид можно выделить из смеси нуклеотидов, также образующихся при гидролизе. Таким путем можно качественно и количественно определить концевые группы и рассчитать длину цепи. Рассмотрим несколько более сложный пример. Рибонуклеаза (стр. 84) действует на тетрануклеотид (фиг. 16), у которого концевой циклический пурин-2',3'-фосфат связан через С-5' с предпоследним остатком пиримидиннуклеотида. При этом отщепляется циклический нуклеотид, который можно идентифицировать хроматографически. Такого рода циклические пуриннуклеотиды в отличие от соответствующих пиримидиновых производных не подвергаются дальнейшему действию фермента.

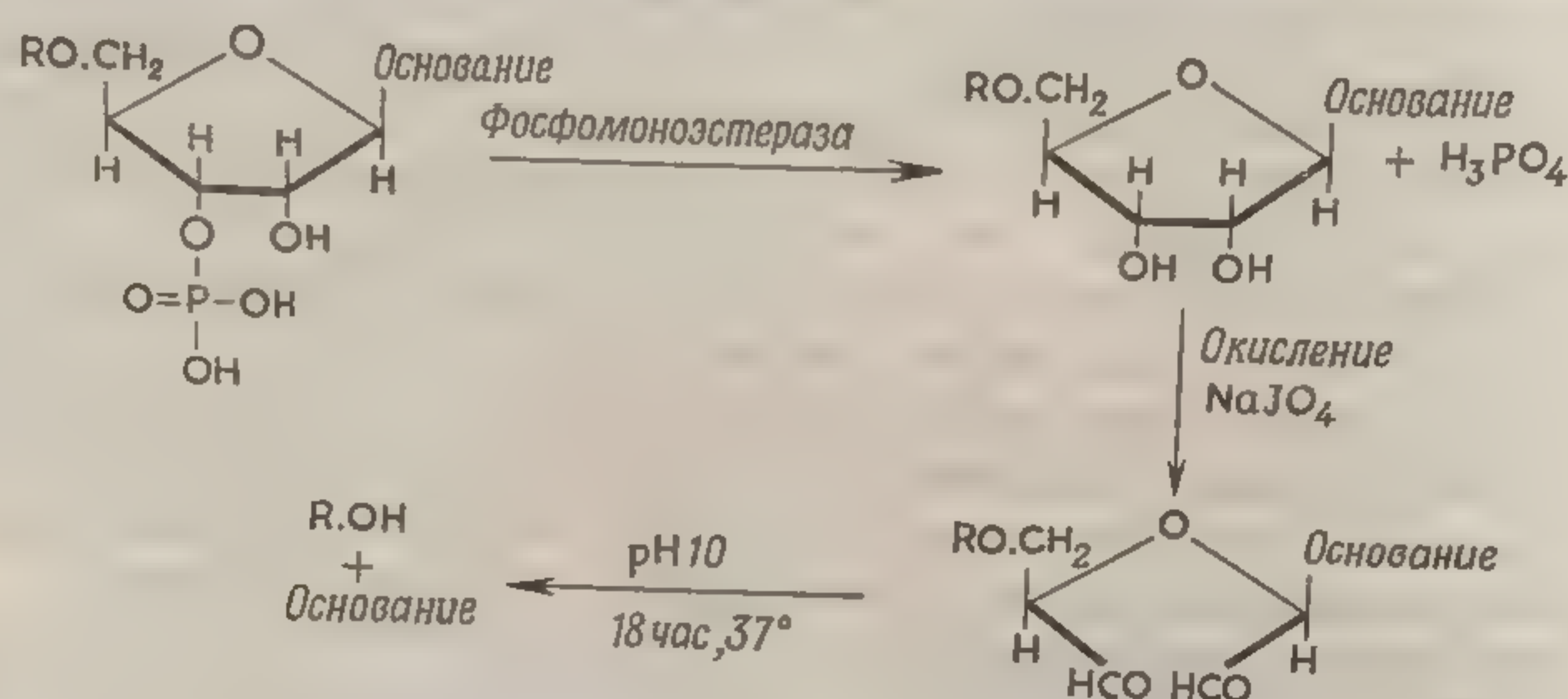
Применяя указанные методы, Маркхэм и Смит [87] идентифицировали концевые группы в полинуклеотидных цепях РНК дрожжей и вируса желтой мозаики турнепса как циклические нуклеотиды аденозин-2',3'-фосфат и гуанозин-2',3'-фосфат.

Уайтфилд [47] описал другой метод определения концевых групп в рибонуклеотидной цепи. По методу Уайтфилда исследуемый препарат полинуклеотида обрабатывают фосфомоноэстеразой для удаления концевых фосфатных групп. После такой обработки концевое углеводное кольцо с его *цис*-гидроксильными группами окисляется периодатом до диальдегидного производного. Полученное в результате соединение в щелочной среде разрушается с образованием свободного основания и полинуклеотида, содержащего на один нуклеотид меньше, чем исходный полинуклеотид (фиг. 17). Этот процесс может быть повторен для удаления нового концевого нуклеотида, и так далее.

Основной метод был предложен Томлинсоном и Тинером [96].

Выяснение последовательности, в которой нуклеотидные единицы расположены вдоль полинуклеотидной цепи, — одна из наиболее важных проблем биохимии нуклеиновых кислот. Однако существенных успехов в данной области пока еще не сделано. Это объясняется отчасти небольшим числом различных мономерных единиц, с которыми приходится иметь дело, отчасти трудностью получения гомогенных образцов РНК. В настоящее время наиболее подходящим материалом для такого рода исследований

служит *s*-РНК. Это обусловлено, во-первых, сравнительной легкостью выделения *s*-РНК, специфической для одной определенной аминокислоты, и, во-вторых, низким молекулярным весом *s*-РНК. Полинуклеотидная цепь *s*-РНК состоит из 70 нуклеотидов и соответствует общей формуле $\phi\Gamma\phi X \dots \phi X\phi\psi\psi\psi A$. Все виды *s*-РНК имеют одинаковый конец цепи — $\phi\psi\psi\psi A$, т. е. присоединение аминокислоты к молекуле *s*-РНК происходит по концевому остатку аденозина. На участке цепи, проксимальном по отношению к этому общему участку, последовательность нуклеотидов варьирует в зависимости от аминокислоты, для которой специфична



Фиг. 17. Определение концевых групп по методу Уитфилда (см. текст).
R' — моно- или полирибонуклеотид.

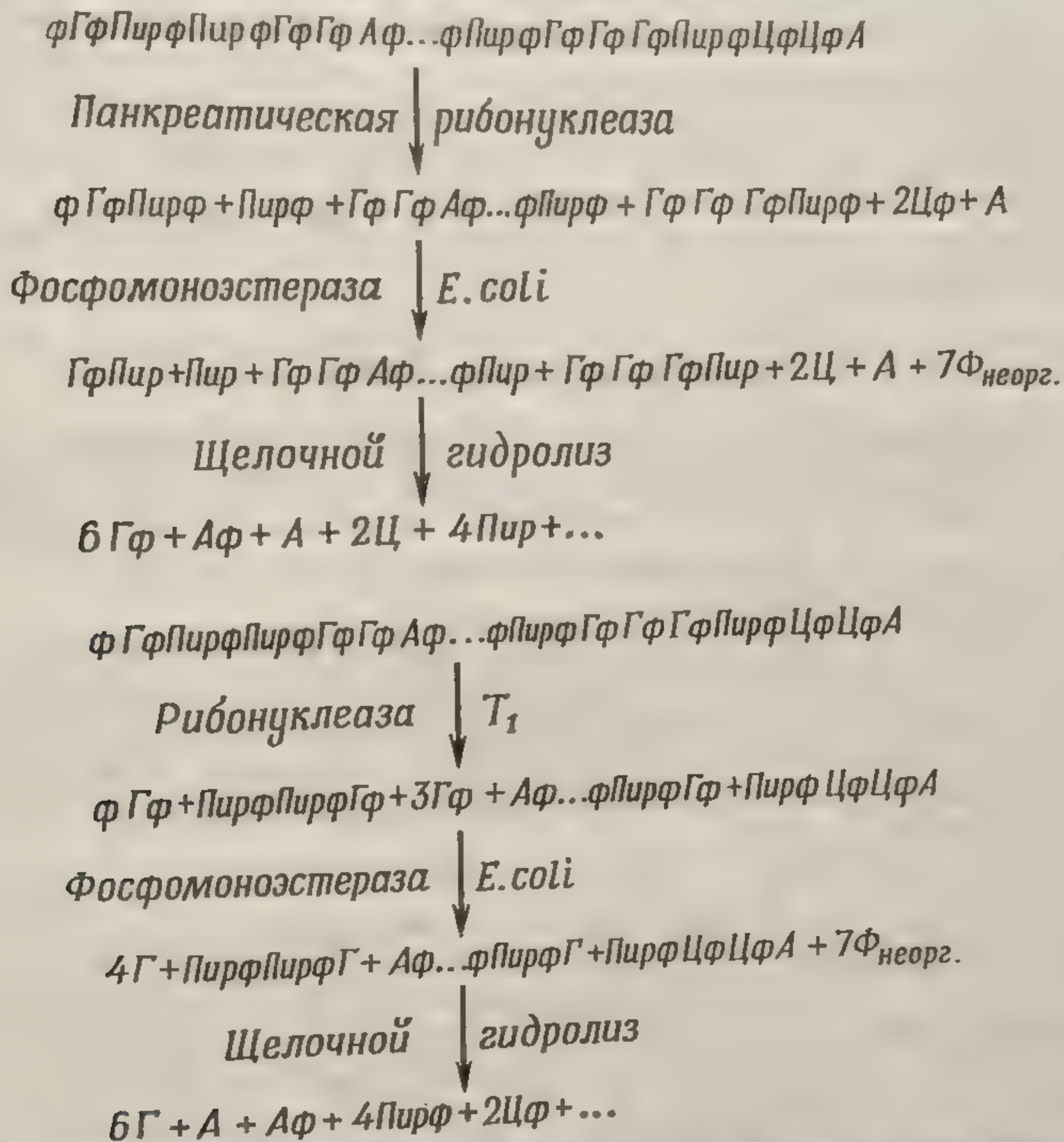
данная *s*-РНК. Например, концевые нуклеотиды *s*-РНК, специфичной для изолейцина, расположены в порядке $\phi\Gamma\phi\psi\psi$ (УФЦ) — $\phi A\phi\psi\psi\psi A$, а в цепи *s*-РНК, специфичной для лейцина, — либо $\phi\Gamma\phi\psi\psi A\phi\psi\psi\psi A$, либо $\phi\Gamma\phi\psi\psi A\phi\psi\psi\psi A$ [48]. Обнаружено, что между *s*-РНК, выделенными из различных источников (из печени, дрожжей и *E. coli*), но специфичными к какой-либо одной аминокислоте, существует большое сходство [18]. Холли с сотрудниками [100] удалось полностью выяснить последовательность расположения нуклеотидов в РНК, служащей переносчиком аланина.

Для иллюстрации методов, применяемых с целью определения последовательности нуклеотидов, рассмотрим работу Кантони и его сотрудников [28, 49—52, 63], исследовавших *s*-РНК из печени кролика. При гидролизе РНК панкреатической рибонуклеазой (стр. 84) молекула разрывается строго между 3'-фосфорилпиримидиннуклеотидами и соседними нуклеотидами, что приводит к образованию смеси 3'-фосфорилпиримидинмононуклеотидов, ряда олигонуклеотидов, содержащих концевую группу ...Пирф и один остаток аденозина на каждую цепь (фиг. 18). Ферментативный же

Фиг. 18.
рибонук.

остаток
и имею
одновре
азой и
на цепь
и ряд с
Обработ

гидролиз, вызванный рибонуклеазой T_1 (из такадиастазы), приводит к специфическому разрыву межинуклеотидных связей между 3'-гуанозин-3'-монофосфатными и 5'-гидроксильными группами смежных нуклеотидов. При этом образуется ряд остатков 3'-ГМФ, несколько олигонуклеотидов с концевой группой ...Гф, один



Фиг. 18. Ферментативное расщепление s-РНК печени панкреатической рибонуклеазой или рибонуклеазой T_1 с последующей обработкой фосфомоноэстеразой.

остаток фГф на цепь и один фрагмент, не содержащий гуанина и имеющий концевую последовательность ЦфЦфА (фиг. 18). При одновременном воздействии на s-РНК панкреатической рибонуклеазой и рибонуклеазой T_1 образуются 3'-ГМФ, один остаток фГф на цепь, один остаток аденозина на цепь, 3'-пиримидиннуклеотиды и ряд олигонуклеотидов с концевой группой ...Гф или ...Пирф. Обработка полученных гидролизатов щелочной фосфатазой из

E. Coli приводит к удалению фосфомоноэфирных групп. Полученные таким путем нуклеозиды и олигонуклеотиды разделялись затем на колонках понообменных смол. Олигонуклеотиды были подвергнуты щелочному гидролизу, что привело к освобождению концевых оснований наряду с нуклеозид-3'(2')-фосфатами. Это дало возможность подробно выяснить строение олигонуклеотидов. Такого рода методами была установлена частота последовательности ряда оснований и оказалось, что она не является случайной. Полученные данные о частоте последовательности оснований были использованы для построения модели полной последовательности оснований *s*-РНК печени кролика (фиг. 22).

Подобные исследования были осуществлены и другими авторами [53—62, 88, 97].

Молекулярный вес РНК

Молекулярный вес РНК можно определить при помощи физических методов — измерением константы седиментации, коэффициента диффузии, удельной вязкости или рассеяния света. Однако между данными, полученными разными авторами, наблюдаются большие расхождения [64].

Наиболее надежные результаты были получены для *s*-РНК, константа седиментации которой при градиентном центрифугировании равна 4 S. Молекулярный вес этой РНК составляет от 23 000 до 28 000 [18]. Близкие значения были получены в результате химических определений молекулярного веса, основанных на анализе концевых групп.

Среди рибосомных РНК обнаружено два основных вида. Из рибосом *E. coli* с константой седиментации 50 S и 30 S (фиг. 48) получены РНК с молекулярным весом $1,12 \cdot 10^6$ (23 S-РНК) и $0,56 \cdot 10^6$ (16S-РНК) соответственно [65]. Было высказано предположение, что обе эти РНК построены из одной и той же субъединицы, причем 23S-РНК является димером 16S-РНК [91]. Однако это заключение не соответствует действительности, поскольку рассматриваемые виды РНК различаются по относительному расположению оснований [92, 93]; кроме того, в опытах по гибридизации они образуют гибриды с различными частями бактериального генома (стр. 239).

Рибосомы с константой седиментации 70 S и 80 S, полученные из клеток млекопитающих, также содержат два вида *r*-РНК, по-видимому соответствующие рибосомным субъединицам 30 S и 50 S. Молекулярный вес этих РНК варьирует в зависимости как от источника их получения, так и использованных методов разделения и анализа [64] в пределах от $0,7 \cdot 10^6$ — $1,0 \cdot 10^6$ (18—22 S) до $1,6 \cdot 10^6$ — $2,1 \cdot 10^6$ (28—34 S).

Для РНК некоторых вирусов, например вируса табачной мозаики, молекулярный вес составляет, по-видимому, не менее $2 \cdot 10^6$.

Имеющиеся в литературе данные о молекулярном весе *m*-РНК далеко не однозначны. Однако в общем можно указать цифру $0,5 \cdot 10^6$ или выше.

Вторичная структура РНК

Как будет показано в следующей главе, спиральное строение ДНК не вызывает сомнений. Что касается природы вторичной и третичной структуры РНК, то она изучена значительно хуже, хотя уже частично выяснена [101].

В растворах с низкой ионной силой молекулы РНК ведут себя подобно типичным сильно набухшим полиэлектролитным цепям. Однако повышение ионной силы раствора вызывает сокращение цепей, что проявляется в сравнительно низкой удельной вязкости и высокой скорости седиментации. Это, по-видимому, объясняется спариванием оснований в некоторых участках цепи РНК, подобно тому как это происходит в некоторых биосинтетических полирибонуклеотидах.

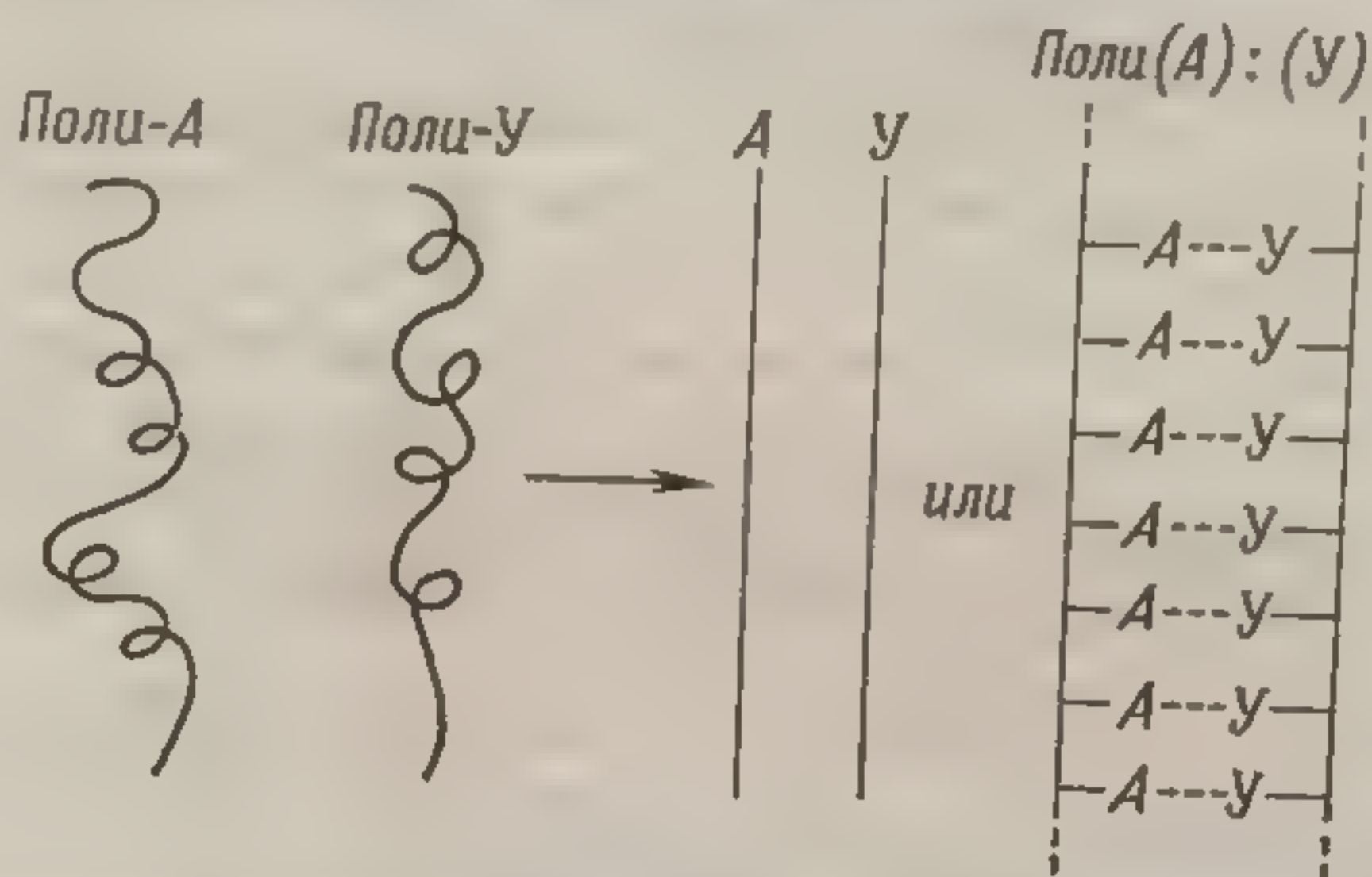
При помощи фермента полинуклеотидфосфорилазы (см. стр. 252) можно получить биосинтетические полирибонуклеотиды с некоторыми довольно интересными свойствами. Если в качестве субстрата используют аденозиндифосфат (АДФ), то образующийся полимер представляет собой рибополинуклеотид, содержащий только одно основание — аденин. Обычно он обозначается как поли-А. Таким же образом из субстрата УДФ можно получить поли-У, а из эквимольной смеси АДФ и УДФ — продукт поли-АУ.

Эти биосинтетические полимеры ведут себя по отношению к щелочам и гидролитическим ферментам таким же образом, как встречающиеся в природе полирибонуклеотиды.

При смешивании эквимольных количеств поли-А и поли-У в разбавленных водных растворах образуется комплекс поли(А) : (У), в котором адениловые остатки одной цепи соединены водородными связями с урациловыми остатками комплементарной цепи [66, 67] (фиг. 19). Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о том, что этот комплекс, подобно ДНК, представляет собой двойную спиральную структуру. На один виток спирали приходится 10 пар оснований, причем шаг этой спирали составляет 34 \AA .

Образование спирального комплекса сопровождается уменьшением поглощения при 260 мкм на 34% по сравнению с суммарной величиной поглощения для обоих компонентов (*гипохромный эффект*).

По многим свойствам такой спиральный комплекс напоминает ДНК. Так, у него обнаружены явления «молекулярного плавления», или «перехода спираль — клубок». При нагревании этого комплекса в 0,15 М растворе NaCl в условиях нейтрального pH до температуры около 60°, называемой *температурой плавления* ($T_{пл}$), поглощение в области 260 мкм резко увеличивается на 34% (*гиперхромный эффект*). Одновременно значительно уменьшается специфическое оптическое вращение при 589 мкм. Эти изменения, обусловленные расхождением при нагревании двух составляющих спираль цепей, оказываются обратимыми при восстановлении



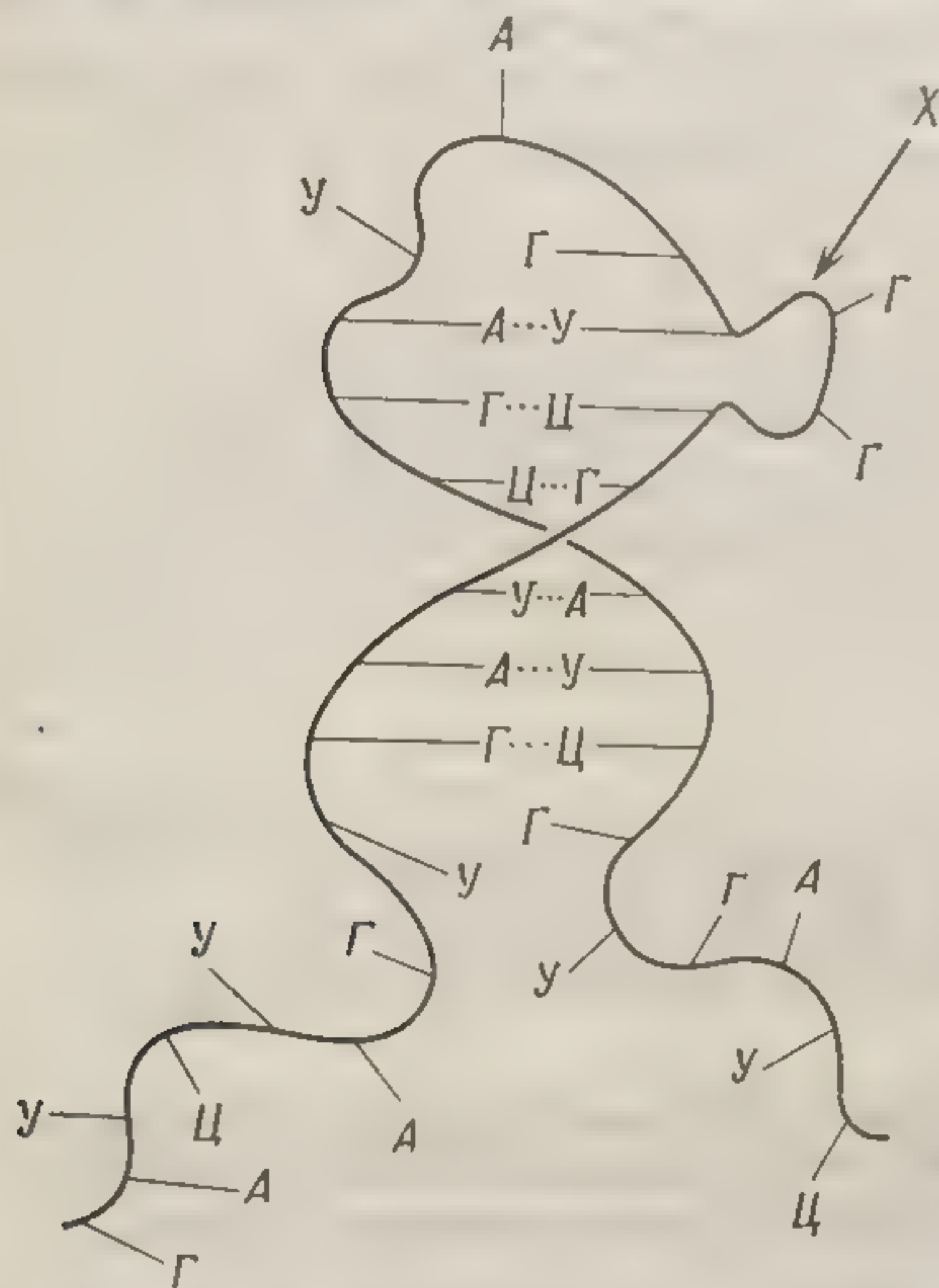
Фиг. 19. Ассоциация отдельных цепей поли-А и поли-У с образованием комплекса поли-(А):(У), в котором две цепи соединены между собой за счет водородных связей между А и У. По своей третичной структуре комплекс представляет собой спираль.

спиральной структуры под действием охлаждения. Более подробно эти явления описаны в следующей главе, посвященной ДНК.

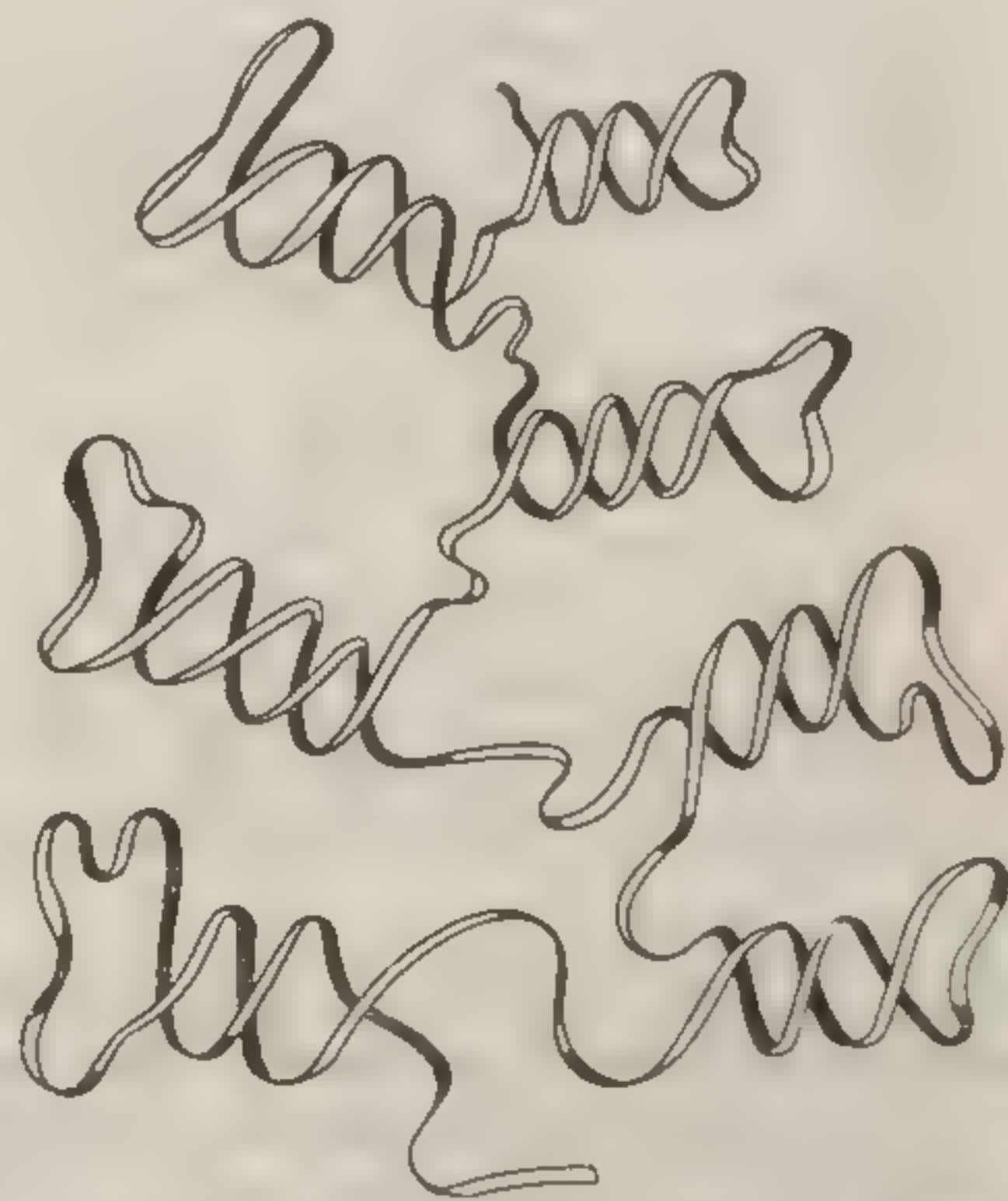
При нагревании растворов природной рибосомной РНК или РНК некоторых вирусов, например вируса табачной мозаики (ВТМ) (стр. 152), наблюдаются такие же, хотя и менее четко выраженные, изменения. Это говорит о том, что в некоторых местах цепь РНК сгибается на себя таким образом, что пары оснований сближаются и соединяются водородными связями, образующимися между аденином и урацилом и между гуанином и цитозином (фиг. 20). Поскольку сегменты цепи, сближающиеся таким путем, могут оказаться не точно комплементарными, образование пар облегчается тем, что некоплементарные участки образуют выступающие петли (буква X на фиг. 20). Как показал рентгеноструктурный анализ, те участки молекулы, в которых цепь РНК сгибается на себя, имеют спиральное строение. Таким образом, молекула РНК представляет собой, по-видимому, полинуклеотидную цепь, некоторые участки которой имеют форму коротких и неполных спиралей. В этих участках образуются пары оснований

аденин — урацил и гуанин — цитозин. В формировании подобных спиралей принимают участие 40—70% всех нуклеотидов молекулы (фиг. 21) [64, 68—70].

Растворимая, или транспортная, РНК представляет собой цепь из примерно 70 нуклеотидов с общей последовательностью нуклеотидов фГфХ . . . фУфЦфЦфА (стр. 52). Цепь эта сгибается на себя, образуя как бы одну шпильку, завитую в двойную



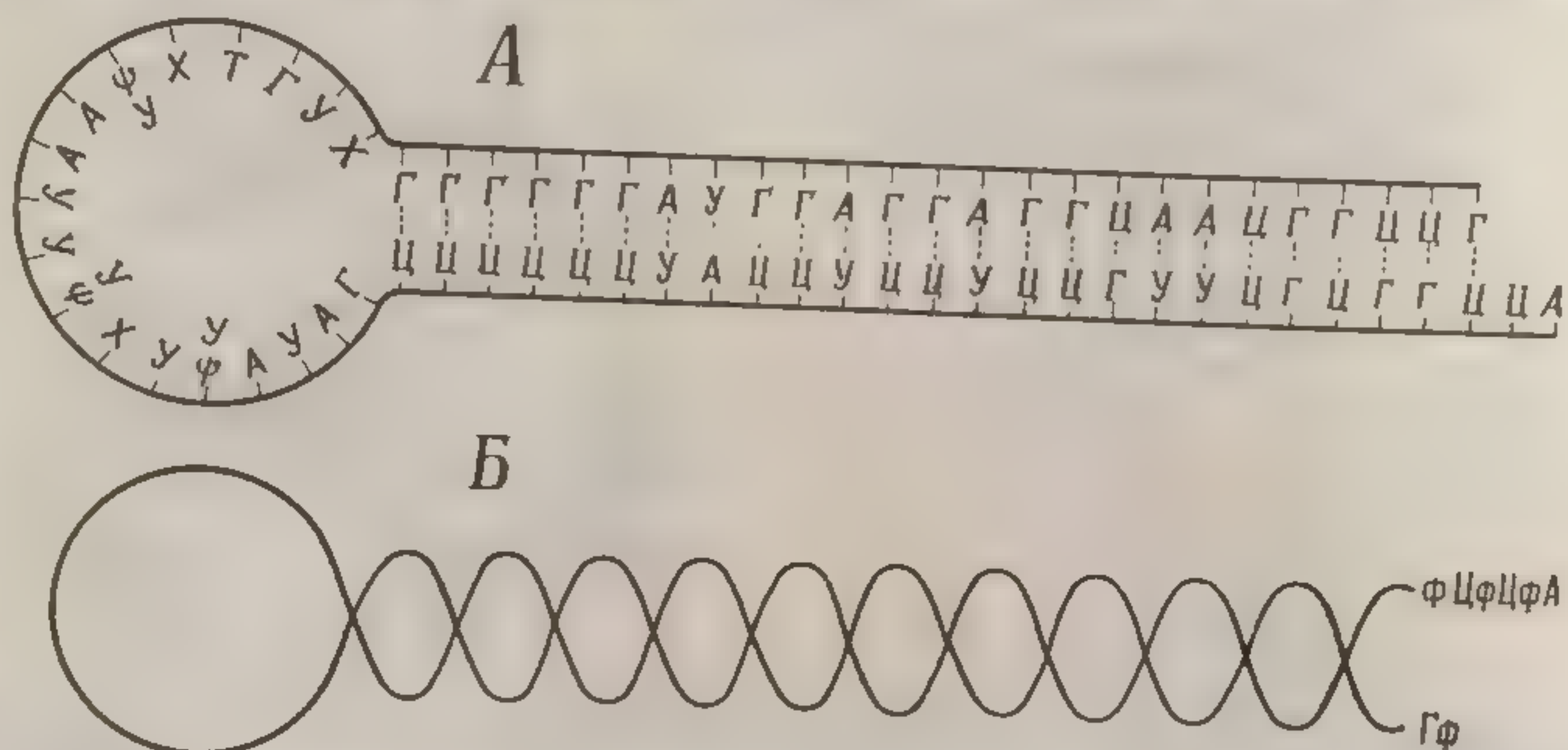
Фиг. 20. Вторичная структура РНК. Виден спиральный участок со спаренными комплементарными основаниями [69]. Буквой X отмечена петлевидная часть спирали.



Фиг. 21. Вторичное строение РНК. Видны многочисленные спиралевидные участки полинуклеотидной цепи [64].

спираль [63, 68, 71—73]. Мак-Калли и Кантони [49—51] установили, что в среднем молекула s-РНК из печени кролика содержит 70 остатков следующих оснований: 11 — аденина, 21 — гуанина, 20 — цитозина, 11 — урацила, 3 остатка рибозилурацила (псевдоуридин) и 4 других минорных основания. Исходя из результатов изучения последовательности нуклеотидов (стр. 52), эти авторы предложили несколько моделей относительного расположения нуклеотидов в s-РНК; одна из таких моделей изображена на фиг. 22. В этой модели представлена средняя из возможных последовательностей оснований; молекулы s-РНК, специфических для разных аминокислот, несомненно, отличаются друг от друга по точному чередованию оснований.

Предположение о том, что полинуклеотидная цепь молекулы сворачивается на себя, образуя двойную спираль с максимальной длиной участков, состоящих из спаренных последовательностей, подтверждают следующие фактические данные: 1) эквивалентность между количеством аденина и урацила, с одной стороны, и между количеством цитозина и гуанина — с другой; 2) степень гиперхромизма, форма кривой плавления и неожиданно высокая величина температуры плавления, подтверждающие существование очень стабильной спиральной структуры с максимальным теоретически возможным числом пар оснований А — У и Г — Ц;



Фиг. 22. А. Схематическое изображение возможной модели, отражающей последовательность оснований в *s*-РНК печени кролика [49—51]. Б. Схематическое изображение спиралевидного строения молекулы *s*-РНК.

3) изменение свойств *s*-РНК под действием некоторых ферментов. Например, фосфодиэстераза змеиного яда вызывает постепенный гидролиз *s*-РНК с того конца молекулы, к которому присоединяется аминокислота. При этом 40%-ный гидролиз приводит к тому, что гипохромный эффект уменьшается на 90% в результате почти полного удаления одного витка спирали. Кроме того, *s*-РНК значительно более чувствительна к рибонуклеазе и полинуклеотидфосфорилазе (стр. 252), чем промышленный препарат дрожжевой РНК.

Все перечисленные свойства *s*-РНК свидетельствуют о сравнительной устойчивости вторичной структуры, включающей два комплементарных тяжа, соединенных водородными связями между аденином и урацилом и между гуанином и цитозином. Спиральное строение молекулы подтверждается данными рентгеноструктурного анализа [71, 72].

Изучение продуктов постепенного разрушения *s*-РНК диэстеразой змеиного яда привело к заключению, что 5-рибозилурацил

(псевдоуридин) и другие минорные основания сосредоточены в центре цепи, т. е. в петле «шпилькообразной» структуры. Эта петля несет, по-видимому, триплет оснований, образующих участок, обратный кодону, или «антикодон», по которому в процессе реализации генетической информации происходит узнавание соответствующей аминокислоты (стр. 268). По обе стороны антикодона могут располагаться два остатка псевдоуридина.

В некоторых других видах РНК также обнаружено формирование спиральных структур. Сообщалось, например, что комплементарная РНК (стр. 237), получаемая ферментативным путем *in vitro* на ДНК (как на матрице), выделенной из бактериофага Т2, содержит при определенных условиях высокоупорядоченную двойную спиральную структуру, сходную с таковой ДНК [74]. Однако это, по-видимому, не относится к информационной РНК, присутствующей в полисомах (стр. 281). Форму двойной спирали имеют также РНК различных вирусов, в том числе РНК реовируса раневой опухоли и репликативных форм вируса полиомиелита [36, 74, 75], вируса Сендай [76] и вируса энцефаломиокардита [77]. Об этом свидетельствуют результаты, полученные при определении относительного содержания комплементарных оснований и при изучении тепловой денатурации; о том же говорят и устойчивость к панкреатической рибонуклеазе и отсутствие реакции с формальдегидом, а также данные рентгеноструктурного анализа [78, 95].

Получены четкие доказательства (см. стр. 161 и 250) того, что репликация РНК вирусов сопровождается образованием двухцепочечной репликативной формы РНК. В качестве примера можно назвать репликативную форму РНК, образующуюся при действии РНК-зависимой РНК-полимеразы (РНК-синтетазы) в клетках *E. coli*, инфицированных РНК бактериофага MS2 (стр. 250). Эта РНК устойчива к рибонуклеазе, но при нагревании до высоких температур (от 102 до 104°) наступают резкие изменения. При быстром охлаждении образуется чувствительное к действию рибонуклеазы вещество; устойчивость к рибонуклеазе восстанавливается, если это вещество охладить до температуры ниже ее температуры плавления [79—84, 94]. При градиентном центрифугировании двухцепочечная форма характеризуется несколько меньшей плотностью, чем соответствующая одноцепочечная.

Химический синтез рибополинуклеотидов

Корана и его сотрудники [85, 86] разработали химические методы специфического синтеза межнуклеотидных связей (С-3')-(С-5') и применили их для синтеза рибополинуклеотидов двумя путями — последовательно и при помощи полимеризации. Им уда-

лось синтезировать, например, динуклеотиды типа АФУФ и ЦФУФ, тетра nukлеотид УФАФУФУ и гомологичные аденинполи нуклеотиды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davidson J. N., Weymouth C., Biochem. J., 38, 375 (1914).
2. Davidson J. N., Frazer S. C., Hutchison W. C., Biochem. J., 49, 311 (1951).
3. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Biochem. J., 52, 600 (1952).
4. Chargaff E., Magasanik F., Vischer E., Green C., Coniger R., Elson D., J. Biol. Chem., 186, 51 (1950).
5. Volkin E., Carter C. E., J. Amer. Chem. Soc., 73, 1516 (1951).
6. Kay E. R. M., Dounce A. L., J. Amer. Chem. Soc., 75, 4041 (1953).
7. Crestfield A. M., Smith K. C., Allen F. W., J. Biol. Chem., 216, 185 (1955).
8. Kirby K. S., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 3, p. 1 (J. N. Davidson and M. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1964).
9. Peterman M. L., Pavlovic A., J. Biol. Chem., 238, 3717 (1963).
10. Brown F., Newman J. F. E., Stewart D. L., Nature, 197, 590 (1963).
11. Bradley D. F., Rich A., J. Amer. Chem. Soc., 78, 5898 (1956).
12. Goldthwait D. A., J. Biol. Chem., 234, 3245 (1959).
13. Boman H. G., Jherten S., Arch. Biochem. Biophys., Suppl., 1, p. 276 (1962).
14. Mandell J. D., Hershey A. D., Anal. Biochem., 1, 66 (1960).
15. Sueoka N., Cheng, J. Mol. Biol., 4, 161 (1962).
16. Sueoka N., Yamane T., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1454 (1962).
17. Vinograd J., Hearst J. E., Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 20, 372 (1962).
18. Brown G. L., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 2, p. 259 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
19. Apgar J., Holley R. W., Merrill S. H., J. Biol. Chem., 237, 796 (1962).
20. Goldstein J., Bennett T. P., Craig L. C., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 119 (1964).
21. Doctor B. P., Connolly Carol M., Rishizky G. W., Sober H. A., J. Biol. Chem., 238, 3985 (1963).
22. Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Scott J. F., Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 811 (1960).
23. Stephenson M. L., Zamecnik P. C., Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 1627 (1961).
24. Stephenson M. L., Zamecnik P. C., Proc. Nat. Acad. Sci., 7, 91 (1962).
25. Chargaff E., Essays on Nucleic Acids, Elsevier Amsterdam (1963).
26. Colowick S. P., Kaplan N. O., Methods in Enzymology, Vol. III, Section V, Articles 100 to 105, New York, Academic Press (1957).
27. Elson D., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 17, 367 (1955).
28. Cantoni G. L., Gelboin H. V., Luborsky S. W., Richards H. H., Singer M. F., Biochem. Biophys. Acta, 61, 354 (1962).
29. Dunn D. B., Smith J. D., Spahr P. F., J. Mol. Biol., 2, 113 (1960).
30. Spahr P. F., Tissieres A., J. Mol. Biol., 1, 237 (1959).
31. Hayes D., Hayes F., Gros F., (1961), quoted by Gros et al. (1961).

32. Wade H. E., Morgan D. M., *Nature*, **171**, 529 (1953).
33. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **49**, 401 (1951).
34. Schaffer F. L., Moore H. F., Schwerdt C. E., *Virology*, **10**, 530 (1960).
35. Faulkner P., Martin E. M., Sved S., Valentine R. C., Work T. S., *Biochem. J.*, **80**, 597 (1961).
36. Gomatatos P. J., Tamm I., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **49**, 707 (1963).
37. Cohn W. E., Volkin E., *J. Biol. Chem.*, **203**, 319 (1953).
38. Whitfield P. R., Heppel L. A., Markham R., *Biochem. J.*, **60**, 15 (1955).
39. Cohn W. E., 3rd Internat. Cong. Biochem (Conferences et Rapports), p. 152 (1955).
40. Brown D. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, **44**, (1952).
41. Brown D. M., Todd A. R., *The Nucleic Acids*, Vol. 1, p. 409 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1955). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1957, стр. 275).
42. Brown D. M., Fasman G. D., Magrath D. J., Todd A. R., Cochran W., Wolfson M. M., *Nature*, **172**, 1184 (1953).
43. Cavaliere L. F., *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5268 (1953).
44. Dunn D. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 286 (1959).
45. Markham R., *Biochem. Soc. Symp.*, **14**, 5 (1957).
46. Heppel L. A., Ortiz P. J., Ochoa S., *J. Biol. Chem.*, **229**, 679 (1957).
47. Whitfield P. R., *Biochem. J.*, **58**, 390 (1954).
48. Berg P., Lagerkvist U., Dieckmann M., *J. Mol. Biol.*, **5**, 159 (1962).
49. McCully K. S., Cantoni G. L., *J. Biol. Chem.*, **237**, 3760 (1962).
50. McCully K. S., Cantoni G. L., *J. Mol. Biol.*, **5**, 497 (1962).
51. Cantoni G. L., Ishikura H., Richards H. H., Tanaka K., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28**, 123 (1963). (Синтез и структура нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1966, стр. 106.)
52. Felsenfeld G., Cantoni G. L., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**, 818 (1964).
53. Staehelin M., *J. Mol. Biol.*, **8**, 470 (1964).
54. Holley R., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Merrill S. H., Zamir A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28**, 117 (1963). (Синтез и структура нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1966, стр. 106.)
55. Herbert E., Wilson Carolyn W., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 750 (1962).
56. Herbert E., Wilson Carolyn W., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 762 (1962).
57. Lagerkvist U., Waldenström J., *J. Mol. Biol.*, **8**, 28 (1964).
58. Bell D., Tomlinson R. V., Tener G. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **10**, 304 (1963).
59. Bell D., Tomlinson R. V., Tener G. M., *Biochemistry*, **3**, 317 (1964).
60. Ingram V. M., Sjöquist J. A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28**, 133 (1963).
61. Ingram V. M., Pierce J. G., *Biochemistry*, **1**, 580 (1962).
62. Litt M., Ingram V. M., *Biochemistry*, **3**, 560 (1964).
63. Nihei T., Cantoni G. L., *J. Biol. Chem.*, **238**, 3991 (1963).
64. Спирин А. С. *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 1, p. 301 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Нуклеиновые кислоты, М., «Мир», 1965, стр. 185.)
65. Kurland C. G., *J. Mol. Biol.*, **2**, 83 (1960).

66. Warner R. C., J. Biol., Chem., 229, 711 (1957).
67. Rich A., Davies D. R., J. Amer. Chem. Soc., 78, 3548 (1956).
68. Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P., Nature, 188, 98 (1960).
69. Fresco J. R., Informational Macromolecules, p. 121 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963).
(Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 100.)
70. Fresco J. R., Klotz L. C., Richards E. G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 83 (1963).
71. Spencer M., Fuller W., Wilkins M. H. F., Brown G. L., Nature, 194, 1014 (1962).
72. Spencer M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 77 (1963).
Синтез и структура нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1966, стр. 156.
73. Zubay G., Takamami M., Biochem. Biophys. Res. Comm., 15, 207 (1964).
74. Geiduschek E. P., Moohr J. W., Weiss S. B., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1078 (1962).
75. Gomatos P. J., Tamm I., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 878 (1963).
76. Тихоненко Т. И., Киселев Ф. Л., Букринская А. Г., Смирнов Я., Nature, 202, 1363 (1964).
77. Montagnier L., Sanders F. K., Nature, 199, 664 (1963).
78. Langridge R., Gomatos P. J., Science, 141, 694 (1963).
79. Strauss J. H., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 7, 43 (1963).
80. Kelly R. B., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 8, 602 (1964).
81. Weissman C., Borst P., Science, 142, 1188 (1963).
82. Weissman C., Simon L., Borst P., Ochoa S., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 99 (1963).
83. Weissman C., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., Ochoa S., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 890 (1964).
84. Weissman C., et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 682 (1964).
85. Lapidot Y., Khorana H. G., J. Amer. Chem. Soc., 85, 3857 (1963).
86. Rammler D. H., Lapidot Y., Khorana H. G., J. Amer. Chem. Soc., 85, 1989 (1963).
87. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., 52, 552, 558, 565 (1962).
88. Herbert E., Smith C. J., Wilson C. W., J. Mol. Biol., 9, 376 (1964).
89. Fraenkel-Conrat H., Signer B., Tsugita A., Virology, 14, 54 (1961).
90. Brownhill T. J., Jones A. S., Stacey M., Biochem. J., 73, 434 (1959).
91. Aronson A. I., McCarthy B. J., Biophys. J., 1, 215 (1961).
92. Aronson A. I., J. Mol. Biol., 5, 453 (1962).
93. Aronson A. I., Biochim. Biophys. Acta, 72, 176 (1963).
94. Langridge R., Billeter M. A., Borst P., Burdon R. H., Weissman C., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 114 (1964).
95. Tomita K., Rich A., Nature, 201, 1160 (1964).
96. Tomlinson K., Tener G. M., Biochemistry, 2730 (1963).
97. Bergquist P. L., Scott J. F., Biochim. Biophys. Acta, 87, 199 (1964).
98. Ralph R. K., Bellamy A. R., Biochim. Biophys. Acta, 87, 9 (1964).
99. Greenman D. L., Kenney F. T., Wicks W. D., Biochim. Biophys. Res. Commun., 17, 449 (1964).
100. Holley R. W., et al., Science, 147, 1462 (1965).
101. Спринг А. С., Macromolecular structure of ribonucleic acids, London, Methuen (1963).

ГЛАВА V

ПОЛУЧЕНИЕ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ДНК

Методы выделения и очистки ДНК

ДНК представляет собой полимер, мономерными единицами которого являются дезоксирибонуклеозидмопфосфаты. В большинстве случаев ДНК имеют высокий молекулярный вес в пределах 10^6 — 10^9 и даже выше.

В природе ДНК находится в клеточном ядре в виде дезоксирибонуклеопротеида. Для выделения ДНК необходимо сначала экстрагировать дезоксирибонуклеопротенд и затем отделить ДНК от связанного с ней белка. Нуклеопротендный комплекс можно экстрагировать с 1 М раствором NaCl [1, 2]. При встряхивании вязкого раствора с хлороформом, содержащим немного октилового или амилового спирта [3], белок образует гель на поверхности раздела хлороформ — вода, тогда как натриевая соль нуклеиновой кислоты остается в водной фазе. Удобнее отделять ДНК от белка при помощи детергентов, например додецилсульфата натрия [4] или ксиленсульфоната натрия [5]. Однако обычно ДНК выделяют при помощи фенола. Фенольный метод выделения ДНК более подробно описан в работах Кирби [6—8].

Выбор того или иного метода для выделения ДНК в каждом конкретном случае определяется природой использованного биологического материала. С подробным описанием методов выделения ДНК из животных и растительных тканей и из бактерий можно познакомиться в другой работе [9]. При работе с микроорганизмами одним из наиболее подходящих является метод Мармура [10]. Он сводится к разрушению клеток, денатурации клеточных остатков и удалению РНК при помощи рибонуклеазы с последующим избирательным осаждением ДНК изопропанолом. С целью предотвращения загрязнения ДНК двувалентными ионами металлов и разрушения ее дезоксирибонуклеазой добавляют хелирующие агенты и додецилсульфат натрия.

Для хроматографической очистки ДНК применяются колонки из фосфата кальция [11, 12], анионообменников из замещенной целлюлозы, например эцтеола-целлюлозы [13, 14], или полиметакрилата магния (амберлит IRC-50) [15]. Колонки из метилированного альбумина могут быть использованы для разделения денатурированной нагреванием и нативной ДНК или даже двух ДНК с различным суммарным содержанием гуанина и цитозина [16].

Разделение нативной и денатурированной ДНК осуществляется также при помощи метода противоточного распределения [8, 17] и при помощи нитроцеллюлозных мембран [18, 31]. Очистка и выделение ДНК с применением градиентного центрифугирования описаны ниже (стр. 65).

Молярные соотношения оснований

Методы определения молярных соотношений оснований в ДНК при помощи гидролиза и хроматографии подробно рассмотрены Бендиком [9].

Как видно из табл. 5, результаты анализа ряда ДНК свидетельствуют о том, что препараты ДНК, выделенные из организмов разных видов, очень различаются по относительному молярному содержанию различных нуклеотидов; в то же время препараты ДНК, выделенные из различных органов и тканей одного и того же вида, весьма близки по составу нуклеотидов.

Таблица 5
Молярные соотношения нуклеотидов * в ДНК из различных источников **

Источник ДНК	Аденин	Гуанин	Цитозин	Тимин	5-метил-цитозин
Зобная железа быка	28,2	21,5	21,2	27,8	1,3
Селезенка »	27,9	22,7	20,8	27,3	1,3
Сперма »	28,7	22,2	20,7	27,2	1,3
Костный мозг крысы	28,6	21,4	20,4	28,4	1,1
Семенники сельди	27,9	19,5	21,5	28,2	2,8
<i>Paracentrotus lividus</i>	32,8	17,7	17,3	32,1	1,1
Зародыш пшеницы	27,3	22,7	16,8	27,1	6,0
Дрожжи	31,3	18,7	17,1	32,9	—
<i>Escherichia coli</i>	26,0	24,9	25,2	23,9	—
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15,1	34,9	35,4	14,6	—
Бактериофаг фХ174	24,3	24,5	18,2	32,3	—

* Молярные соотношения нуклеотидов выражены в молях азотсодержащих компонентов на 100 г-ат.

** Приведенные величины взяты из работ разных авторов.

Чаргафф [19—22] первым обратил внимание на ряд закономерностей в строении ДНК. Так, сумма пуринов равна сумме пиримидинов; сумма аминооснований (аденин и цитозин) равна сумме кетооснований (гуанин и тимин); аденин и тимин содержатся в эквимольных количествах; то же найдено для гуанина и цитозина. Эквивалентность А и Т, а также Г и Ц имеет первостепенное значение для образования присущей ДНК спиральной формы (стр. 68).

ДНК образует два основных класса: «тип АТ», характеризующийся избытком аденина и тимина, и более редко встречающийся «тип ГЦ», в котором преобладают гуанин и цитозин.

В большинстве случаев в молекуле ДНК присутствуют только такие основания, как аденин, гуанин, цитозин и тимин, но в некоторых ДНК цитозин в ограниченной степени может быть замещен 5-метилцитозином. Содержание этого основания особенно высоко в ДНК зародышей пшеницы. В некоторых штаммах бактериофагов цитозин замещен 5-оксиметилцитозином (стр. 157, 158).

По мнению Доти [23], молекула ДНК имеет только два особенно характерных физических свойства — молекулярный вес (стр. 79) и состав, выраженный относительным соотношением пар А — Т и Г — Ц. Пара Г — Ц прочнее, чем А — Т, т. е. больше способствует стабильности спирали ДНК, как это будет показано несколько ниже (фиг. 26). Кроме того, как установлено методом дифференциального центрифугирования, пара Г — Ц в большей мере, чем А — Т, обуславливает высокую плотность ДНК.

При центрифугировании небольшого количества ДНК в концентрированном растворе хлористого цезия вскоре достигается равновесие. Действующие при этом противоположные процессы седиментации и диффузии приводят к установлению стабильного градиента концентраций хлористого цезия с непрерывным повышением плотности в центробежном направлении. Макромолекулы ДНК сдвигаются под действием центробежной силы в зону, где плотность раствора равна собственной плотности ДНК. Этой тенденции противостоит процесс диффузии, в результате чего в условиях равновесия определенный вид ДНК оказывается сосредоточенным в узком слое. При наличии нескольких видов ДНК с различной плотностью каждый из них образует определенный слой в том месте, где плотность раствора хлористого цезия равна плотности данного вида ДНК.

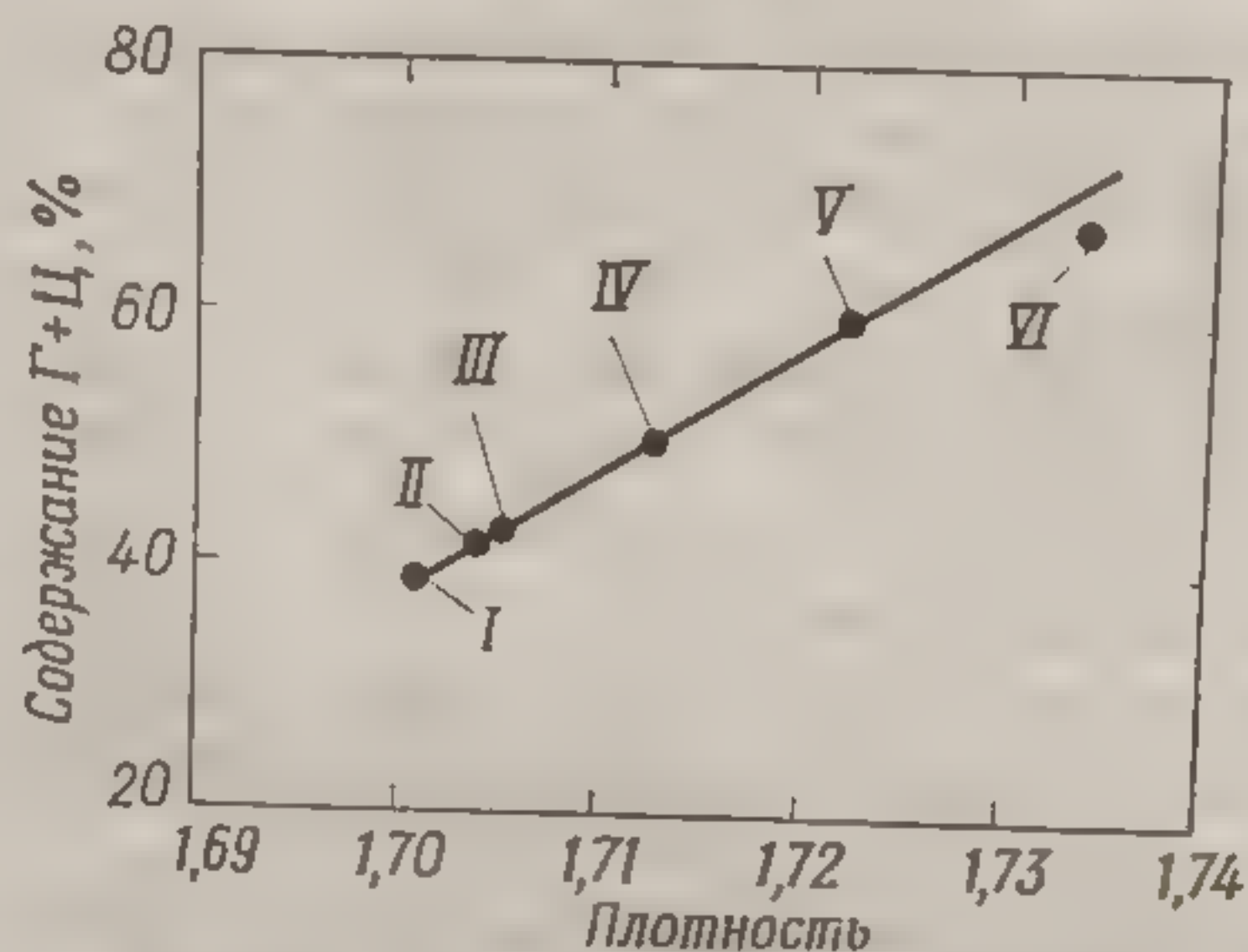
Для выделения фракций ДНК, распределенных по разным слоям раствора с градиентом плотности, на дне центрифужной пробирки прокалывают очень маленькое отверстие и по каплям собирают вытекающий раствор (фиг. 8). Большинство препаратов бактериальных или вирусных ДНК локализуется в узких слоях, что указывает на гомогенность ДНК. В отличие от этого ДНК млекопитающих образуют широкие слои, что, по-видимому, обусловлено их значительной гетерогенностью.

Применение описанного метода позволило установить, что пробы ДНК из разных источников имеют различную плотность, причем последняя находится в прямой зависимости от содержания Г + Ц (фиг. 23). Если величину плотности ДНК, выделенной из *E. coli*, принять за $1,710 \text{ г·см}^{-3}$, то эту зависимость можно

выразить уравнением

$$\rho = 1,660 + 0,098 (\Gamma + \text{Ц}),$$

в котором ρ — плотность, а $(\Gamma + \text{Ц})$ — суммарная фракция гуанина и цитозина в молях [24]. Как будет показано ниже (стр. 75), относительное содержание $\Gamma + \text{Ц}$ можно определить также по температуре денатурации при нагревании [25].



Фиг. 23. Соотношение между плотностью и суммарным содержанием гуанина и цитозина в *n*-ДНК из различных источников [23].
I — *Pneumococcus*, II — сперма лосося, III — зубная железа теленка, IV — *E. coli*, V — *Serratia*, VI — *M. phlei*.

На основании подобного рода измерений удалось установить, что относительное содержание $\Gamma + \text{Ц}$ в ДНК из самых различных источников носит следующий характер [24, 34].

Источник ДНК	$\Gamma + \text{Ц}, \%$	Источник ДНК	$\Gamma + \text{Ц}, \%$
<i>Dactyostelium</i> (миксомицет)	22	Селезенка мыши	44
<i>Micrococcus pyogenes</i>	34	Сперма лосося	44
Вирус вакцины	36	<i>Bacillus subtilis</i>	44
<i>Bacillus cereus</i>	37	Бактериофаг T1	46
<i>B. megaterium</i>	38	<i>Escherichia coli</i>	51
<i>Haemophilus influenzae</i>	39	Бактериофаг T7	51
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39	Бактериофаг T3	53
Зубная железа теленка	40	<i>Neurospora crassa</i>	54
Печень крысы	40	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
Сперма быка	41	<i>Sarcina lutea</i>	72
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	42	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	72
Зародыш пшеницы	43	Вирус герпеса простого	72
Печень цыпленка	43	<i>Mycobacterium phlei</i>	73

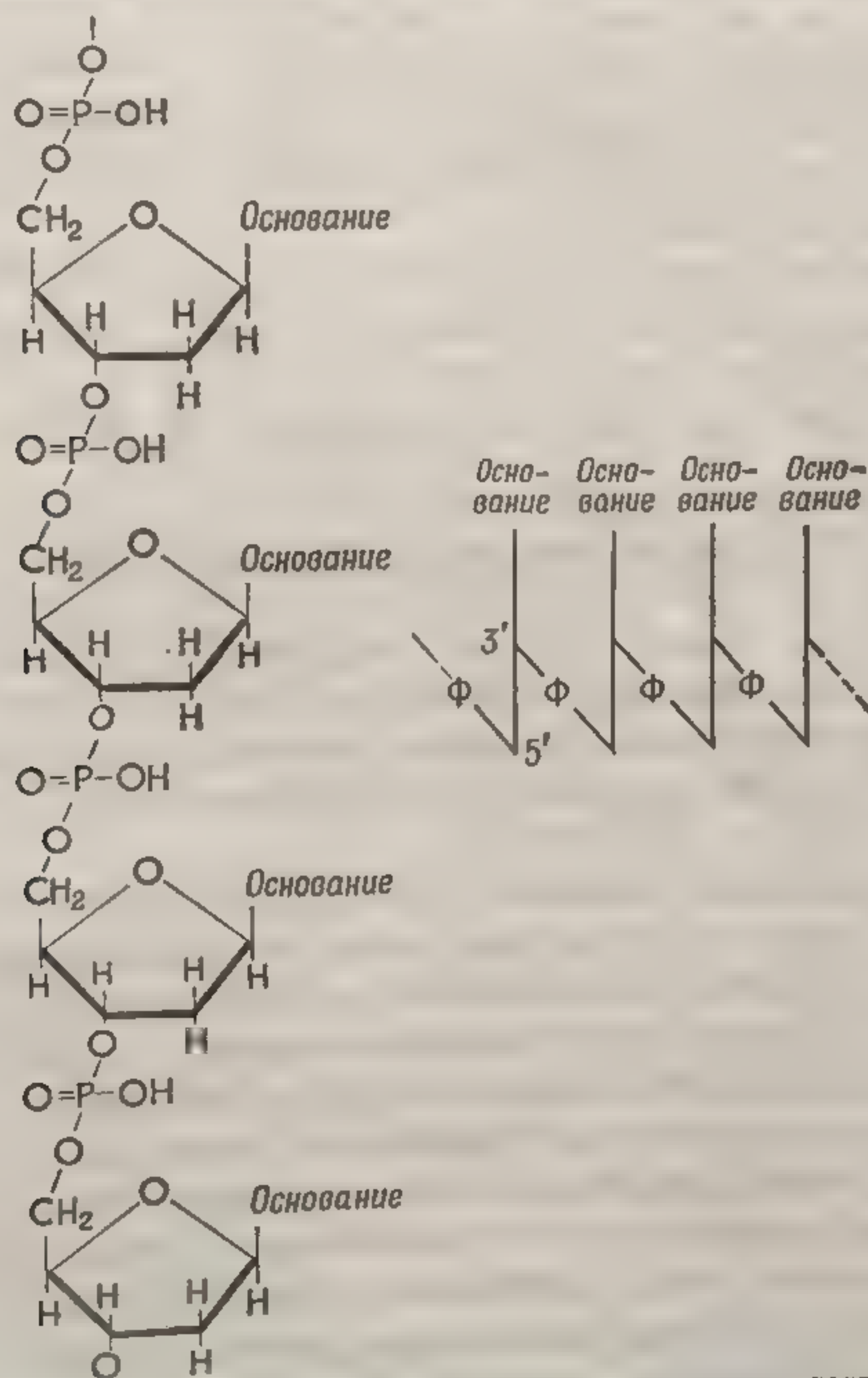
Содержание $\Gamma + \text{Ц}$ в ДНК млекопитающих составляет от 40 до 45%; в бактериальных ДНК оно варьирует в значительно более широких пределах (от 30 до 75%) [26]. Эти различия в содержании оснований представляют интерес в связи с таксономией

бактерий [27, 28, 86] и простейших [29], а также с эволюцией разных организмов [30].

Как будет показано в ходе дальнейшего изложения (стр. 212), ферментативным путем можно получить синтетические полидезоксирибонуклеотиды, содержащие только аденин и тимин или только гуанин и цитозин. Существует и природный поли-д-(А—Т), встречающийся в качестве минорного компонента в ДНК некоторых крабов [32, 33].

Строение ДНК

В молекуле ДНК, как и в РНК, отдельные нуклеотиды соединены между собой фосфодиэфирной связью. При этом С-4' сахара



Фиг. 24. Часть полинуклеотидной цепи ДНК.

участвует в формировании кольца, а С-2' не имеет гидроксильной группы. Следовательно, межнауклеотидные связи могут осуществляться только за счет гидроксильных групп в положениях 3'

и 5' углеводного компонента. Участие этих групп в формировании межнуклеотидных связей подтверждается результатами электрометрического титрования, поскольку при титровании в области рН от 12,0 до 13,5 не обнаружено свободных гидроксильных групп сахара. При помощи такого рода титрования и химических анализов установлено также наличие четырех первичных фосфорильных групп, трех аминогрупп и двух гидроксильных групп пурина — пиримидина на каждые четыре атома фосфора. Эти данные, а также почти полное отсутствие вторичных фосфорильных диссоциаций согласуются с предположением Левина о том, что молекула ДНК имеет вид длинной неразветвленной цепи. Молекулу ДНК можно изобразить в виде полинуклеотидной цепи с фосфодиэфирными связями между углеродами в положениях 3' и 5' (фиг. 24). Обработка препаратов ДНК соответствующими ферментами, действие которых рассматривается в следующей главе, приводит к распаду ДНК с образованием нуклеозид-3'-фосфатов или нуклеозид-5'-фосфатов.

Отсутствие гидроксильных групп при С-2 делает невозможным образование циклического фосфата, в связи с чем щелочной гидролиз ДНК протекает иным путем, чем у РНК. Эта особенность используется для аналитического отделения РНК от ДНК.

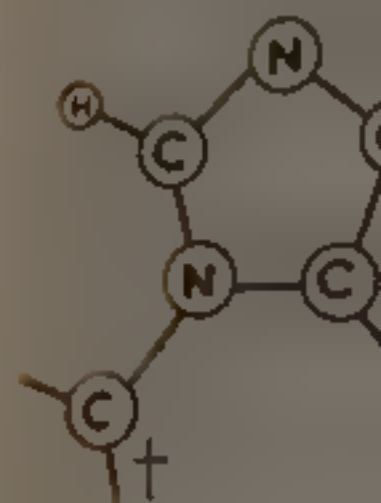
Конфигурация молекулы ДНК

Для изучения молекулярной структуры ДНК был широко использован рентгеноструктурный анализ. Исследования подобного рода были проведены впервые Астбери [35], позже Франклином и Гослингом [36] и наиболее обстоятельно Уилкинсом и сотр. [37—39].

Эти исследования показали, что ДНК дает рентгенограммы двух типов. Если содержание воды в исследуемом препарате составляет около 40%, то получаются рентгенограммы кристаллического типа (А-форма), что свидетельствует о наличии трехмерного строения. При более высоком содержании воды ДНК обнаруживает паракристаллические свойства (В-форма), т. е. молекулы располагаются приблизительно параллельно одна другой, но не в столь строгом порядке, как в кристалле. Изучение ДНК из различных источников дало одинаковые результаты. Кристаллографический период в направлении оси волокна составляет 28 Å для кристаллической формы и 34 Å для паракристаллической формы, а максимальное расстояние между фосфатными группами в полностью развернутой цепи равно всего 7 Å. Следовательно, в пределах одного структурного периода в углеводно-фосфатной цепи повторяется несколько одинаковых химических групп. Принимая

во внима
мысль, ч
винтову
закручен
своими о
Постр
единстве
ли являе
с пирими
ния водо

Аде

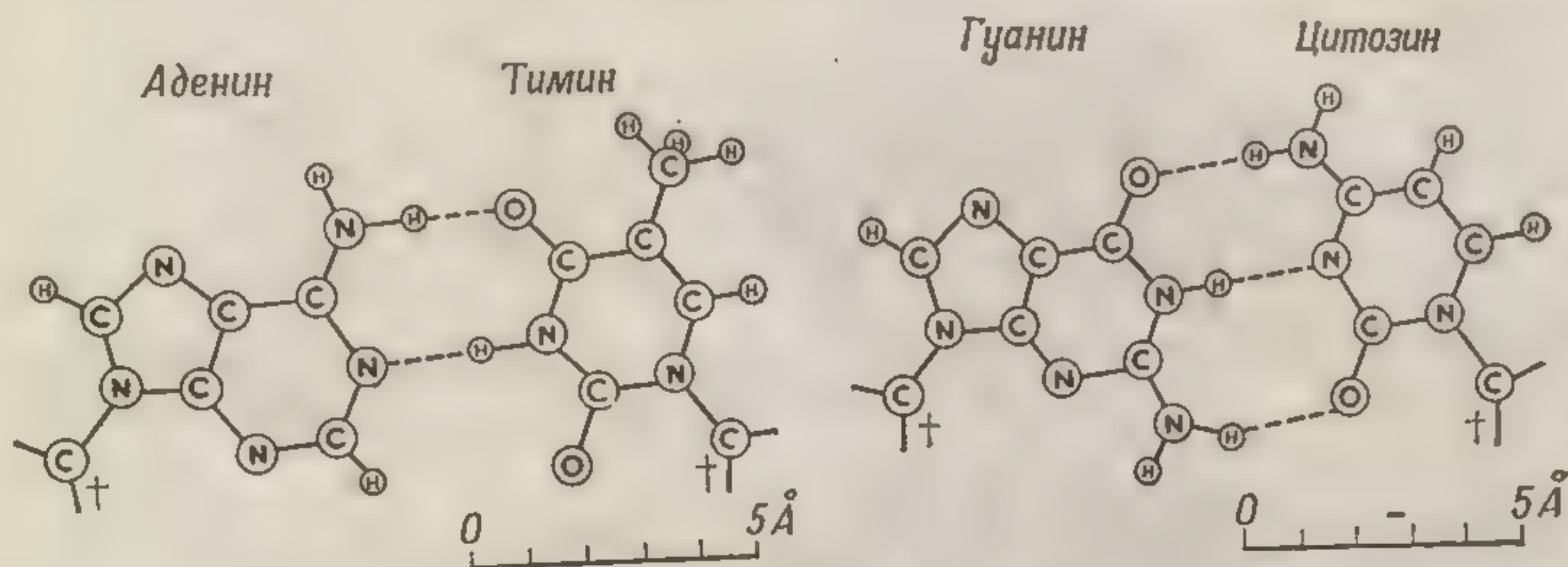


Фиг. 25. С
ные линии

такими п
с цитозин
Как у
в молеку
равно сод
цитозина.
что молек
зано, как
делах этой
аденином
одной цеп
порядок
определяе
ментарной
ным момен
тельности
без всяких
лагаться
Модель
Две продо

во внимание эти и другие данные, Уотсон и Крик [40] высказали мысль, что молекула ДНК представляет собой двойную правовинтовую спираль, состоящую из двух полинуклеотидных цепей, закрученных вокруг одной и той же оси и связанных между собой своими основаниями.

Построив различные модели, Уотсон и Крик показали, что единственно возможным положением оснований описанной спирали является такое, при котором пурин одной цепи образует пару с пиримидином другой цепи. После детального изучения образования водородных связей между основаниями стало очевидным, что

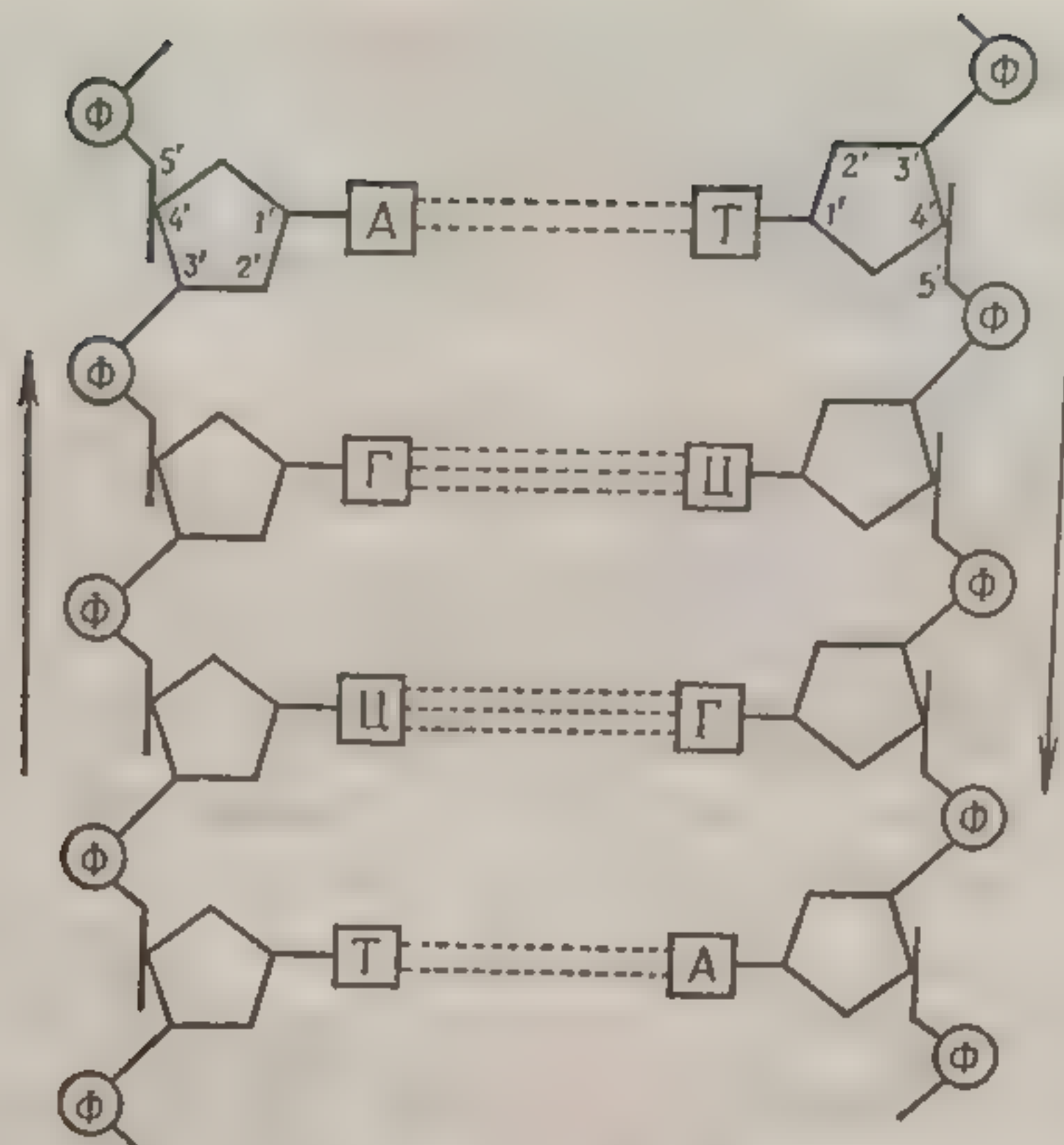


Фиг. 25. Спаривание аденина с тиминном и гуанина с цитозином. Пунктирные линии указывают положение водородных связей. Углеродные атомы, отмеченные знаком \dagger , относятся к кольцам сахара.

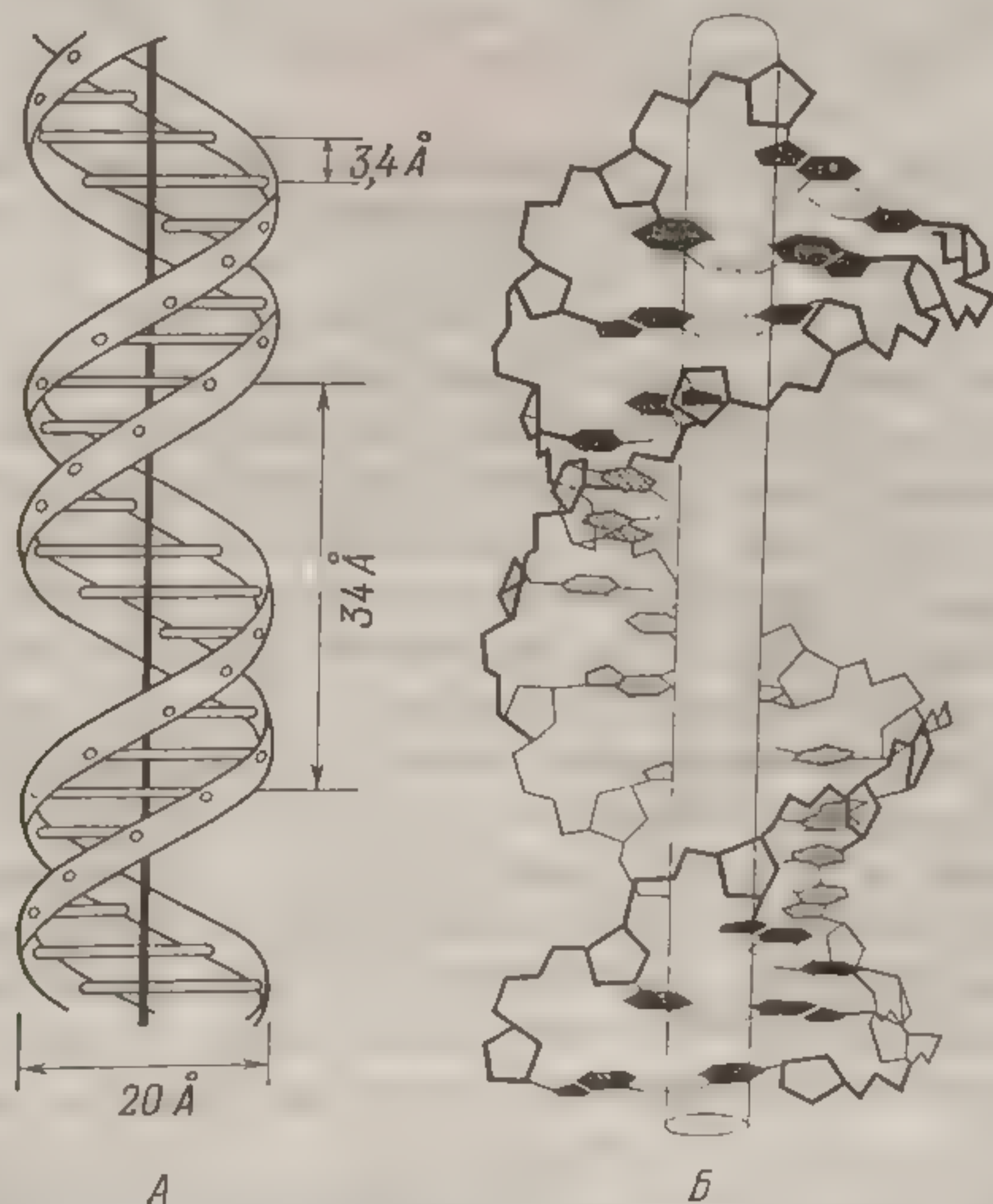
такими парами могут быть только аденин с тиминном и гуанин с цитозином. Расположение водородных связей указано на фиг. 25.

Как уже упоминалось (стр. 64), Чаргафф [19] подчеркивал, что в молекулах ДНК из разных источников содержание аденина равно содержанию тимина, а содержание гуанина — содержанию цитозина. Именно этот факт наиболее убедительно показывает, что молекула ДНК имеет вид двойной спирали. На фиг. 26 показано, каким образом основания могут быть расположены в пределах этой структуры. На рисунке видны водородные связи между аденином одной цепи и тиминном другой, а также между гуанином одной цепи и цитозином другой (и наоборот). В соответствии с этим порядок расположения оснований в одной цепи автоматически определяет последовательность оснований во второй цепи, комбинаторной первой. Эта закономерность является весьма существенным моментом в предложенной модели. Что касается последовательности пар оснований вдоль цепей, то она может варьировать без всяких ограничений. Пары оснований плоские и могут располагаться одна над другой подобно стопке тарелок.

Модель Уотсона—Крика схематически представлена на фиг. 27. Две продольные ленты соответствуют цепям, состоящим из остат-



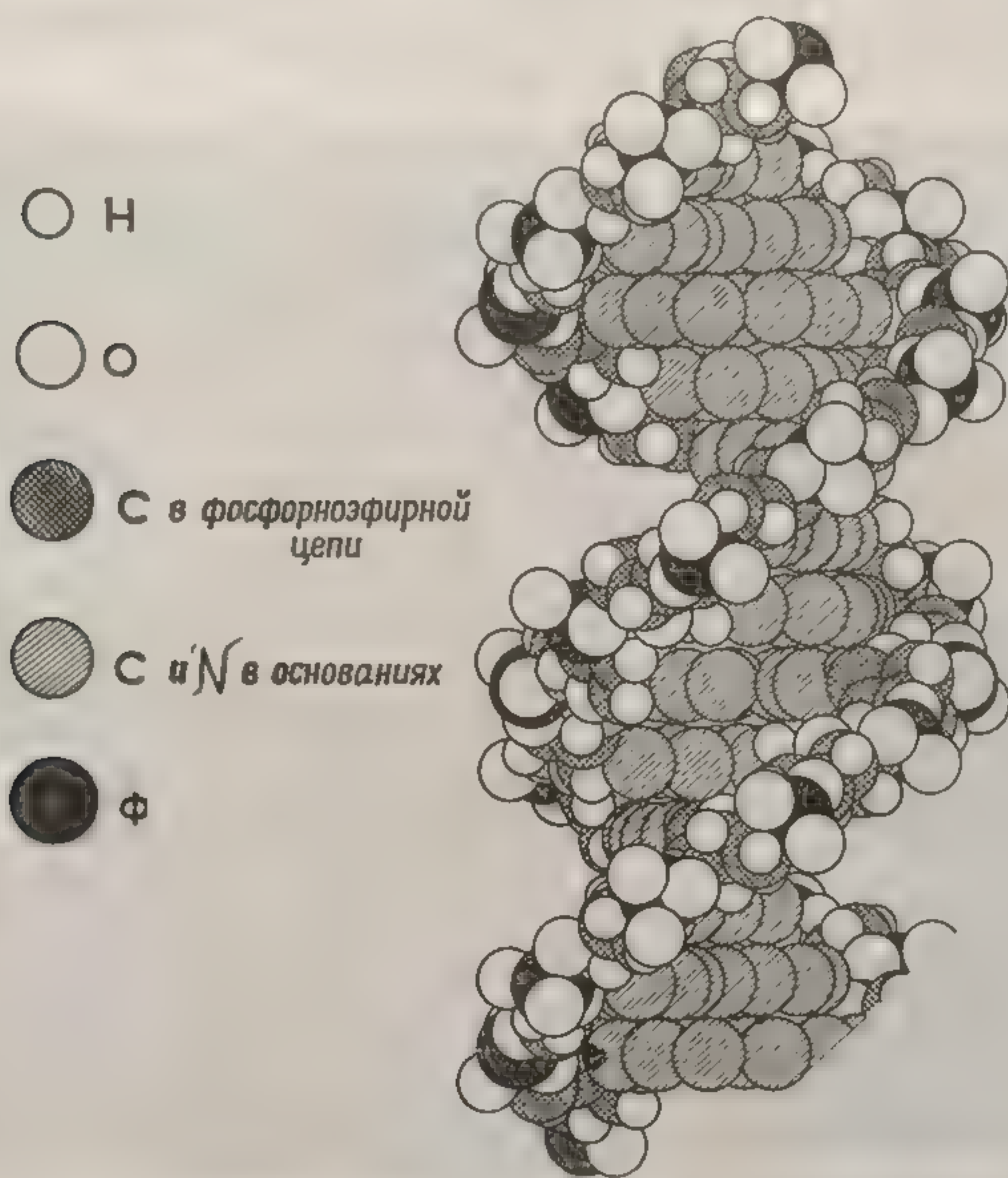
Фиг. 26. Схематическое изображение части гипотетической полинуклеотидной цепи ДНК.



Фиг. 27. А. Схематическое изображение молекулы ДНК по Уотсону—Крику [40]. Две фосфатно-сахарные цепи изображены в виде лент, а пары оснований, удерживающих одну цепь возле другой, — в виде горизонтальных перекладин. В. Рисунок модели двойной спирали ДНК. Пунктирные линии соответствуют водородным связям между основаниями.

ков фосфорной кислоты и сахара. Пары оснований, удерживающие эти цепи вместе, изображены в виде горизонтальных линий, образующих как бы ступеньки винтовой лестницы.

Уилкинс с сотр. [41, 42] внесли небольшую поправку в отдельные детали предложенной Уотсоном и Криком модели, оставив, однако, основную концепцию без изменений. Схема новой модели структуры В изображена на фиг. 28.



Фиг. 28. Модель предполагаемого строения ДНК [41].

Описанное строение ДНК в виде двойной спирали дает удовлетворительное объяснение многим ее физическим свойствам, в том числе ее плотности и содержанию воды; оно отвечает также результатам рентгеноструктурного анализа. Более того, данные рентгеноструктурного анализа, полученные на интактном биологическом материале, например на головках сперматозоидов, дают основание думать, что спиральное строение присуще не только ДНК, экстрагированной из клетки, но также ДНК в самой живой клетке.

Одноцепочечная ДНК и кольцевая ДНК

Одна из наиболее интересных и необычных форм ДНК была впервые выделена Синсгеймером в 1959 г. [43—45] из мелкого вируса ϕ X174, поражающего *E. coli*. Молекула этой ДНК содержит 5500 нуклеотидов и состоит из одной цепи. Одноцепочечная форма этой ДНК подтверждается следующими данными:

1. Отсутствие перехода спираль — клубок при нагревании.
2. Чувствительность к действию фосфодиэстеразы из *E. coli*, специфической для одноцепочечной ДНК.
3. Положительная реакция с формальдегидом; двухцепочечная ДНК не дает такой реакции, так как аминокислоты оснований двухцепочечной ДНК защищены прочными водородными связями двойной спирали.

4. Отсутствие необходимого для образования двойной спирали равенства между молярным содержанием аденина и тимина, а также гуанина и цитозина (табл. 5).

Дальнейшие исследования показали, что ДНК бактериофага ϕ X174, полученная путем очень мягкой экстракции, помимо одноцепочечного строения, отличается еще одной особенностью — ее цепь замкнута, образует кольцо [46, 47]. Так, под действием фосфодиэстеразы из *E. coli* или селезенки не происходит быстрого распада ДНК, следовательно, она не содержит свободных концевых 3'-гидроксильных групп, причем чувствительность к этому ферменту не возрастает после предварительной обработки фосфомоноэстеразой, которая должна была бы удалить концевые фосфатные группы. Более того, при ультрацентрифугировании удается получить два компонента ДНК — инфекционный подвижный компонент S_1 и неинфекционный малоподвижный компонент S_2 . Осторожная обработка компонента S_1 панкреатической дезоксирибонуклеазой вызывает превращение компонента S_1 в компонент S_2 , что сопровождается потерей инфекционности; существенного понижения молекулярного веса при этом не происходит. При более жесткой обработке образуются продукты дальнейшего распада. Все эти результаты подтверждают, что компонент S_1 имеет строение ковалентно связанного кольца и дает при распаде продукт S_2 с открытой цепью.

Кольцевая форма вирусной ДНК обнаружена также у двухцепочечной репликативной формы бактериофага ϕ X174 (стр. 215), ДНК бактериофага λ (стр. 161) и ДНК вируса полиомы, которая существует и в виде кольца и в форме прямой цепи (49—51, 84). В последнем случае обе формы состоят из двойной цепи и обе они инфекционны. Кольцевую структуру можно наблюдать при помощи электронного микроскопа. Предполагается, что кольцевую форму имеет также ДНК бактериофага T2 (стр. 157) [87].

Особая одноцепочечная форма ДНК обнаружена в сочетании с дрожжевой лактатдегидрогеназой. Она содержит 33 нуклеотидные единицы на одну частицу фермента [52].

Физические свойства ДНК

ДНК, полученная современными методами, представляет собой прочные волокна, напоминающие асбест. Натриевые соли ДНК образуют вязкий раствор. Значительная асимметричность молекул

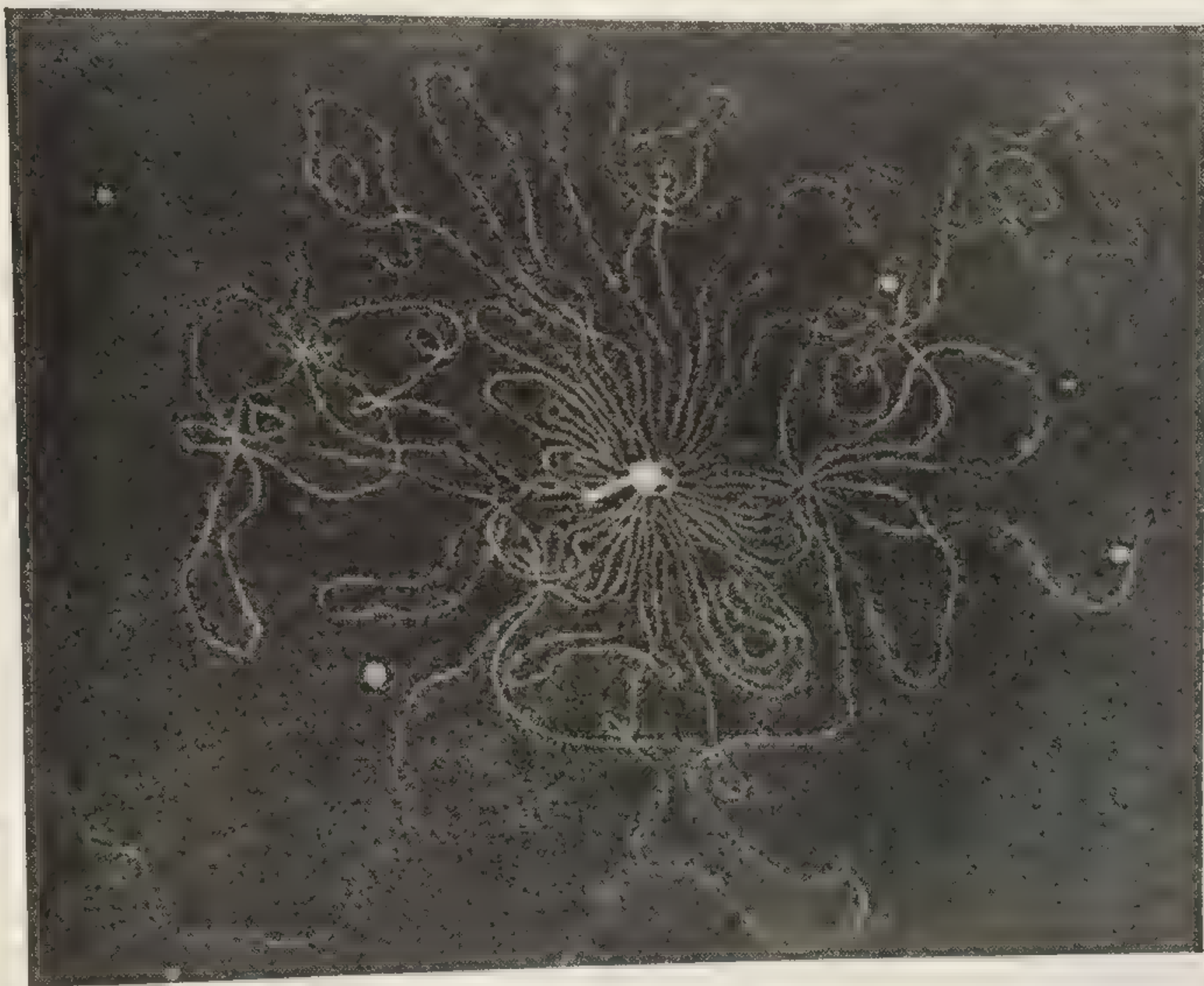


Фото 1. Электронная микрофотография молекулы ДНК, высвобождающейся из осмотически разрушенной фаговой частицы в виде единой нити, оба конца которой видны [88].

ДНК придает этому раствору характерные свойства. Например, такие растворы легко образуют гели и обладают отрицательным двойным лучепреломлением в потоке. Об этом свидетельствует то, что при взбалтывании жидкости палочковидные частицы, которые прежде были распределены хаотически, ориентируются конец к концу, своей длинной осью параллельно направлению потока. Возникающую таким путем анизотропию потока можно обнаружить, поместив сосуд с раствором между скрещенными

призмами Николя. Если жидкость неподвижна, то свет не проходит; если же ее взбалтывают, что она приобретает способность пропускать свет.

Ни одна диаграмма не может дать реального представления о длине молекулы ДНК. Более наглядны электронные микрофотографии. На фото 1 приведена электронная микрофотография молекулы ДНК, выделенной из одной частицы бактериофага [53].

Молекулярный вес ДНК

Молекулярный вес ДНК определяют обычно путем измерения рассеяния света, скорости седиментации или удельной вязкости. Полученные значения, как правило, составляют 10^6 . Однако эта величина, по-видимому, занижена, так как цепи ДНК хрупки и чрезвычайно чувствительны к силам гидродинамического сдвига. Даже взбалтывание раствора или простое выливание его из пипетки может привести к разрыву цепей. Поэтому размеры нативной ДНК в том виде, в каком она существует в клетке, значительно больше, чем это считалось до сих пор.

О справедливости этого предположения говорят данные, полученные при изучении ДНК бактериофага T2 (стр. 157). Очевидно, вся хромосома фага представляет собой единый «кусочек» ДНК с молекулярным весом $1,2 \cdot 10^8$ — $1,6 \cdot 10^8$, содержащий около 200 000 пар оснований и имеющий форму двойной спирали [54]. О таком же молекулярном весе свидетельствуют результаты радиоавтографических исследований [55]. ДНК бактериофага T2, меченную *in vivo* H^3 -тимидином, после мягкого лизиса осторожно экстрагировали и покрывали фотографической эмульсией. В течение 9 недель эмульсия подвергалась действию мягкого β -излучения трития. После проявления на ней можно было рассмотреть непрерывные нити ДНК длиной около 50 мк. Расчеты показали, что такая нить должна содержать 195 000 пар оснований и иметь молекулярный вес около 10^8 .

При помощи метода мягкого лизиса из *E. coli* также были получены неразрушенные нити ДНК длиной около 1 мм, содержащие $3,5 \cdot 10^6$ пар оснований, что соответствует молекулярному весу $2 \cdot 10^9$ [56, 57, 70]. На основании этих данных можно предположить, что вся хромосома *E. coli* представлена одним куском ДНК. Действительно, на электронных микрофотографиях лизированных протопластов *Micrococcus lysodeikticus* виден спутанный клубок ДНК, в котором нет свободных окончаний нити [58]. Предположение, что в некоторых случаях молекула ДНК может принимать кольцевую форму, уже обсуждалось ранее.

Для клеток млекопитающих характерна картина более сложная. Тем не менее было подсчитано, что ДНК одного сперматозои-

да чело
около 1
23 хром
количес

Физи
123, 59—
депатура

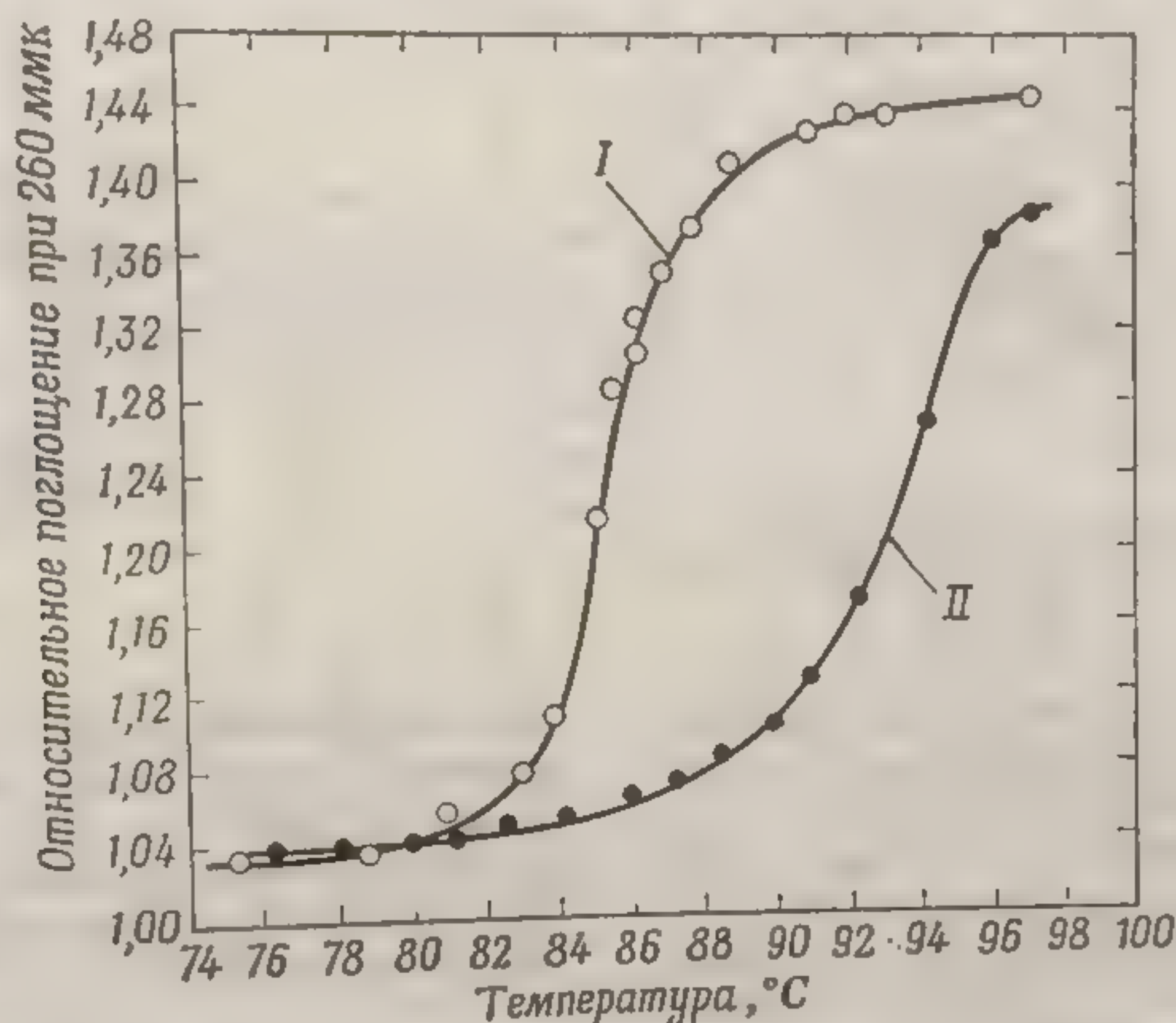
Фиг. 29.

При это
можно
в зоне т
Посколи
тельно
плавле
Г + Ц.
от соде
При
мерно
тате бр
раствор
Но если

да человека содержит около 10^9 пар оснований и имеет длину около 1 м [59]. Конечно, вся эта ДНК распределена между 23 хромосомами. Обычные соматические клетки содержат двойное количество ДНК (стр. 314).

Молекулярные свойства ДНК

Физико-химические свойства ДНК описаны многими авторами [23, 59—66]. Одно из важнейших ее свойств проявляется при денатурации разбавленного водного раствора ДНК нагреванием.

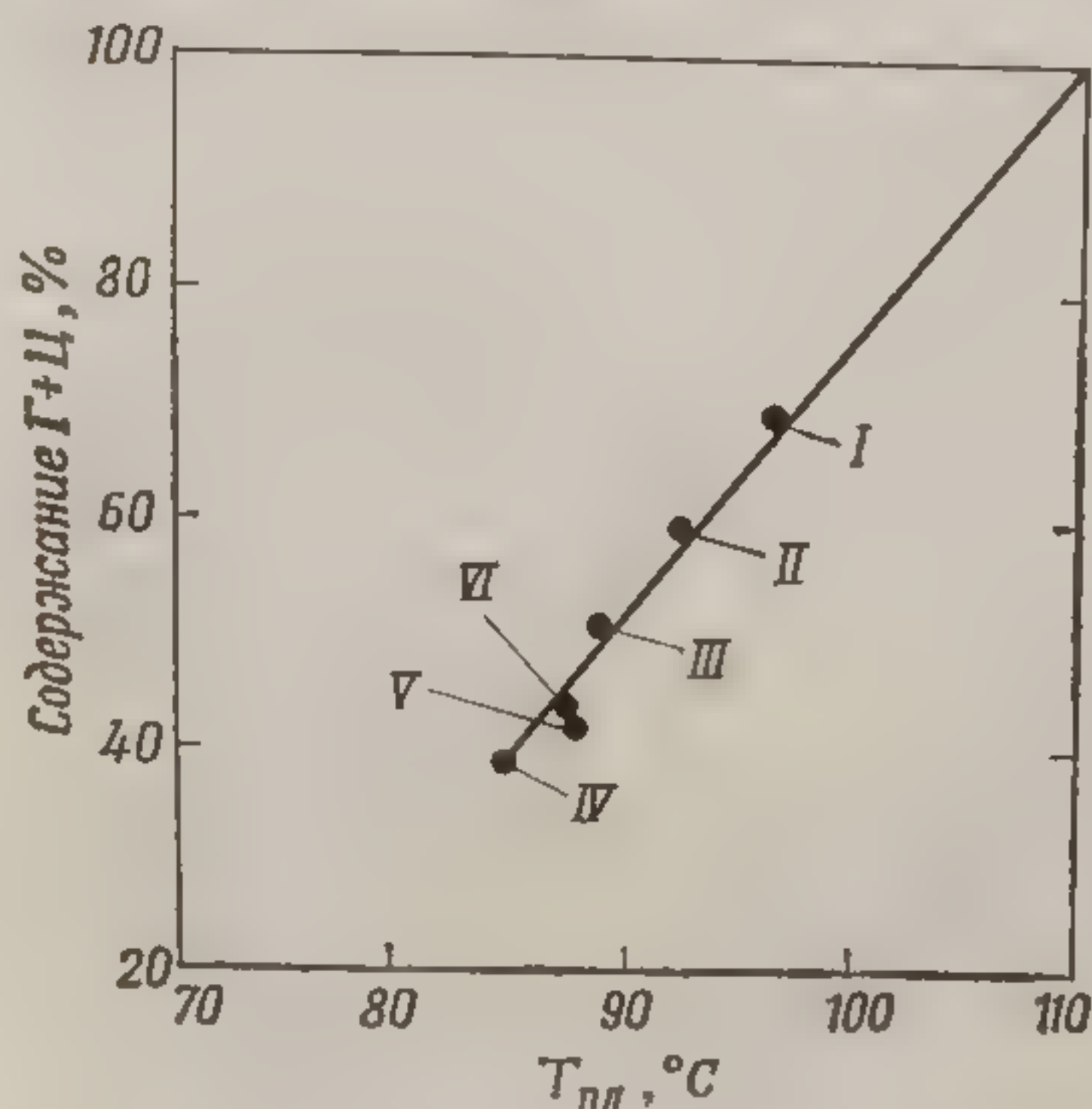


Фиг. 29. Усиление поглощения при 260 мкм у двух разных источников, вызванное повышением температуры [23].
I — *Pseudomonas*, II — *Serratia*.

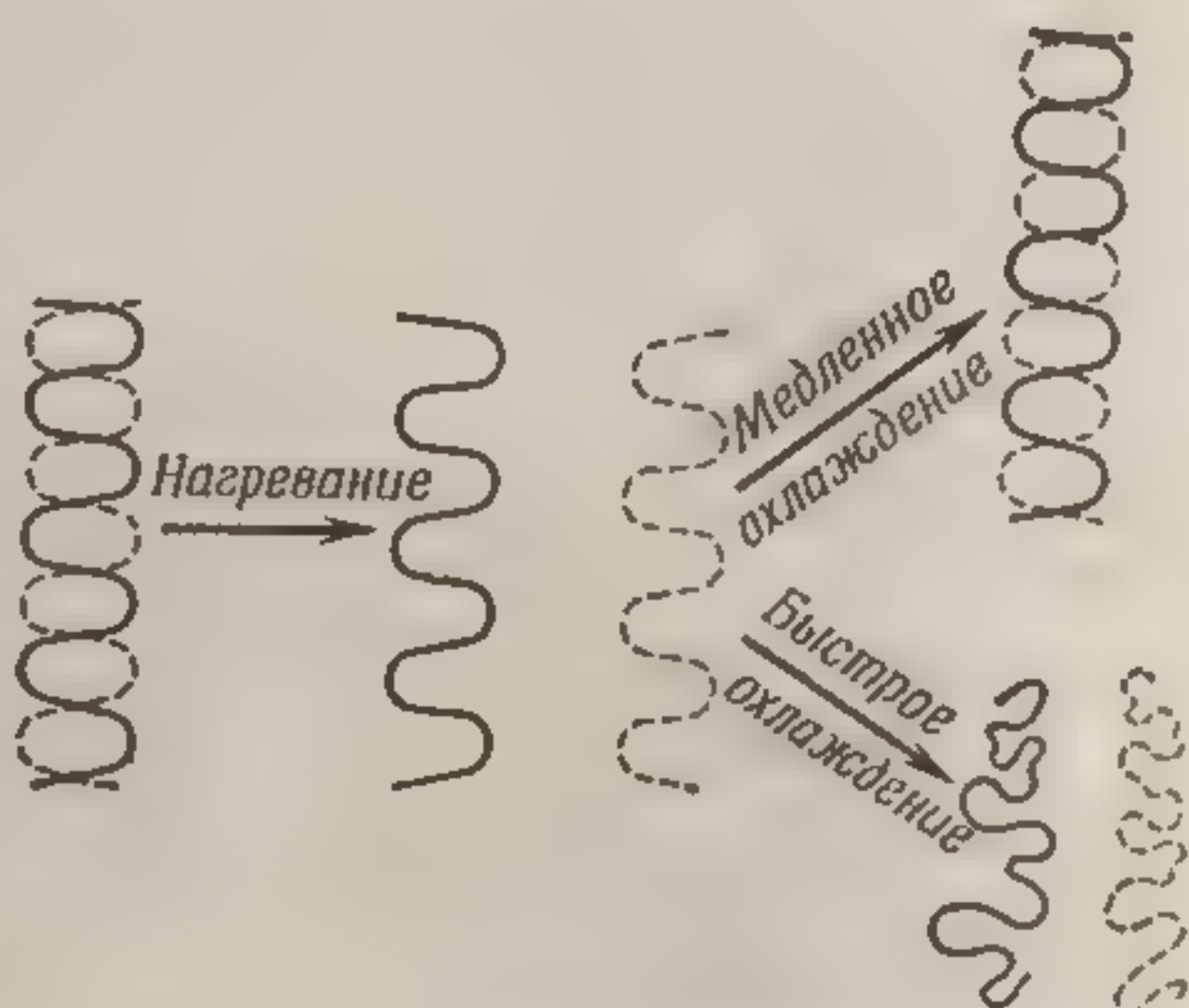
При этом происходит переход спираль — клубок (стр. 56), о чем можно судить по резкому увеличению поглощения при 260 мкм в зоне температуры плавления (фиг. 29) и по снижению вязкости. Поскольку водородная связь между гуанином и цитозином значительно крепче, чем связь между аденином и тиминном, температура плавления выше для ДНК с относительно высоким содержанием Г + Ц. Зависимость температуры плавления различных ДНК от содержания в них Г + Ц выражается прямой линией (фиг. 30).

При температурах, превышающих температуру плавления примерно на 5° , две цепи двойной спирали ДНК расходятся в результате броуновского движения. При быстром охлаждении такого раствора эти цепи остаются отделенными друг от друга (фиг. 31). Но если раствор охлаждать медленно, то может произойти специ-

фическая рекомбинация двух цепей с восстановлением двойной спирали. Эти изменения можно наглядно продемонстрировать при помощи электронной микроскопии. Они подтверждаются также результатами опытов с применением градиентного центрифугирования. Например, плотность нативной формы ДНК пневмококка равна 1,700 (фиг. 32, B). Если ее денатурировать нагреванием,



Фиг. 30. Соотношение между суммарным содержанием гуанина и цитозина и температурой плавления ($T_{пл}$) в ДНК из различных источников [23]. I — *M. phlei*, II — *Serratia*, III — *E. coli*, IV — зубная железа телят, V — сперма лосося, VI — *Pneumococcus*.



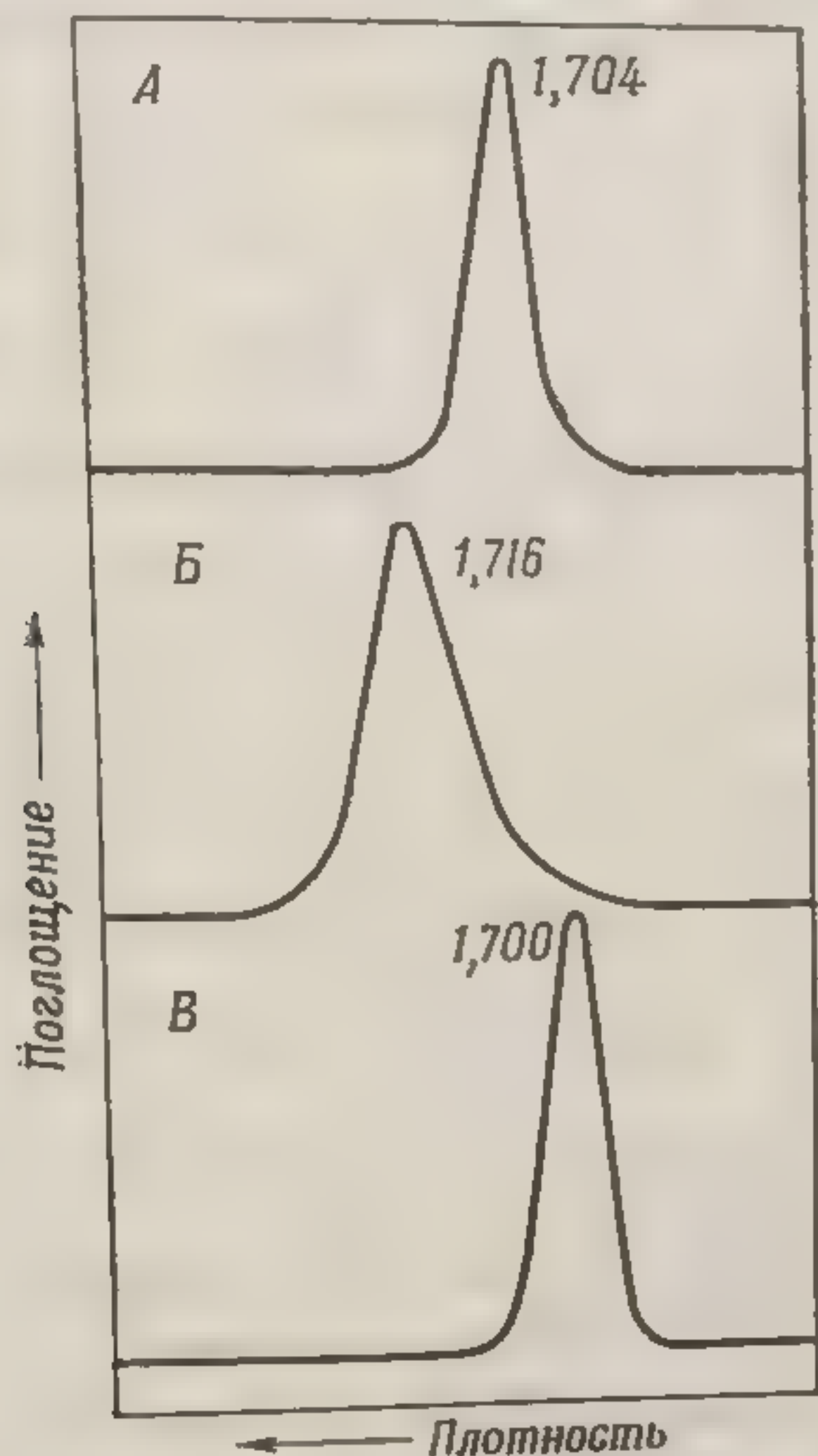
Фиг. 31. Денатурация ДНК нагреванием, вызывающим расхождение цепей. Видно, что при медленном охлаждении происходит ренатурация цепей, а при быстром охлаждении они остаются разделенными.

а затем быстро охладить, то образуется одноцепочечная денатурированная форма с плотностью 1,716; если же раствор охлаждать медленно, то цепи рекомбинируются, образуя спиральную форму с плотностью 1,704 (фиг. 32, A).

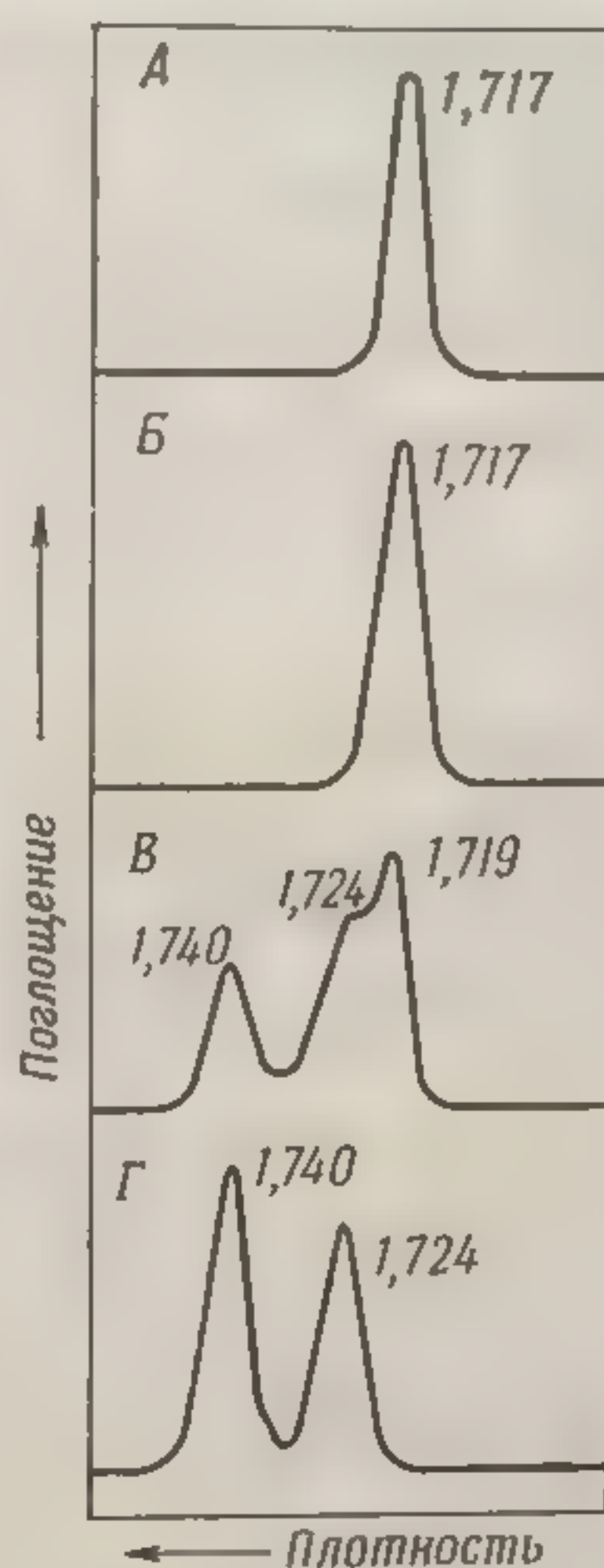
В опытах с ДНК млекопитающих, довольно гетерогенной по природе, такую рекомбинацию осуществить нелегко. Это нетрудно сделать с гомогенными препаратами бактериальной ДНК, причем можно показать, что рекомбинация цепей сопровождается восстановлением биологической активности данной ДНК. Так, при нагревании ДНК пневмококка, обладающей трансформирующей активностью, эта активность теряется, но она в значительной мере восстанавливается при медленном охлаждении.

Явление разделения и специфической рекомбинации цепей удобно продемонстрировать опытами с гибридной ДНК, в которой одна из цепей спирали содержит тяжелый азот (N^{15}). Такую ДНК можно выделить из *E. coli* после одного клеточного деления в среде, содержащей N^{15} . Плотность нативной гибридной ДНК составляет

1,717 (фиг. 33, А). Нагревание препарата в течение 20 мин при 90° не вызывает изменений. Если же раствор нагревать в течение 10 мин при 100° , то цепи расходятся. Подвергнув раствор быстрому охлаждению и затем центрифугированию, можно обнаружить



Фиг. 32. Центрифугирование ДНК в градиенте плотности CsCl. А. ДНК нагревали и медленно охлаждали. Б. ДНК нагревали и быстро охлаждали. В. ДНК не нагревали (нативная ДНК). Приведенные на фигуре числа соответствуют плотности ДНК в различных фракциях [23].



Фиг. 33. Центрифугирование в градиенте плотности гибридной ДНК, одна из цепей которой представлена N^{14} -ДНК, а вторая — N^{15} -ДНК.

А. Нативный гибрид ДНК. Б. После нагревания при 90° в течение 20 мин — эффекта нет. В. После нагревания при $93,8^\circ$ в течение 20 мин две цепи частично отошли друг от друга. Г. После нагревания при 100° в течение 10 мин произошло полное разделение тяжелой и легкой цепей [23].

две цепи — одну с плотностью 1,724 соответствующую одноцепочечной N^{14} -ДНК, другую с плотностью 1,740, соответствующую одноцепочечной N^{15} -ДНК (фиг. 33, Г). При выдерживании гибридной ДНК при температуре плавления в течение 20 мин (т. е. до середины процесса перехода спираль — клубок) с последующим быстрым охлаждением можно получить следующие формы ДНК: около половины всего количества ДНК разделится на легкую одноцепочечную (с плотностью 1,724) и тяжелую одноцепочечную

(с плотностью 1,740); другая половина останется в виде двухцепочечного гибрида (с плотностью 1,719) (фиг. 33, В) [23].

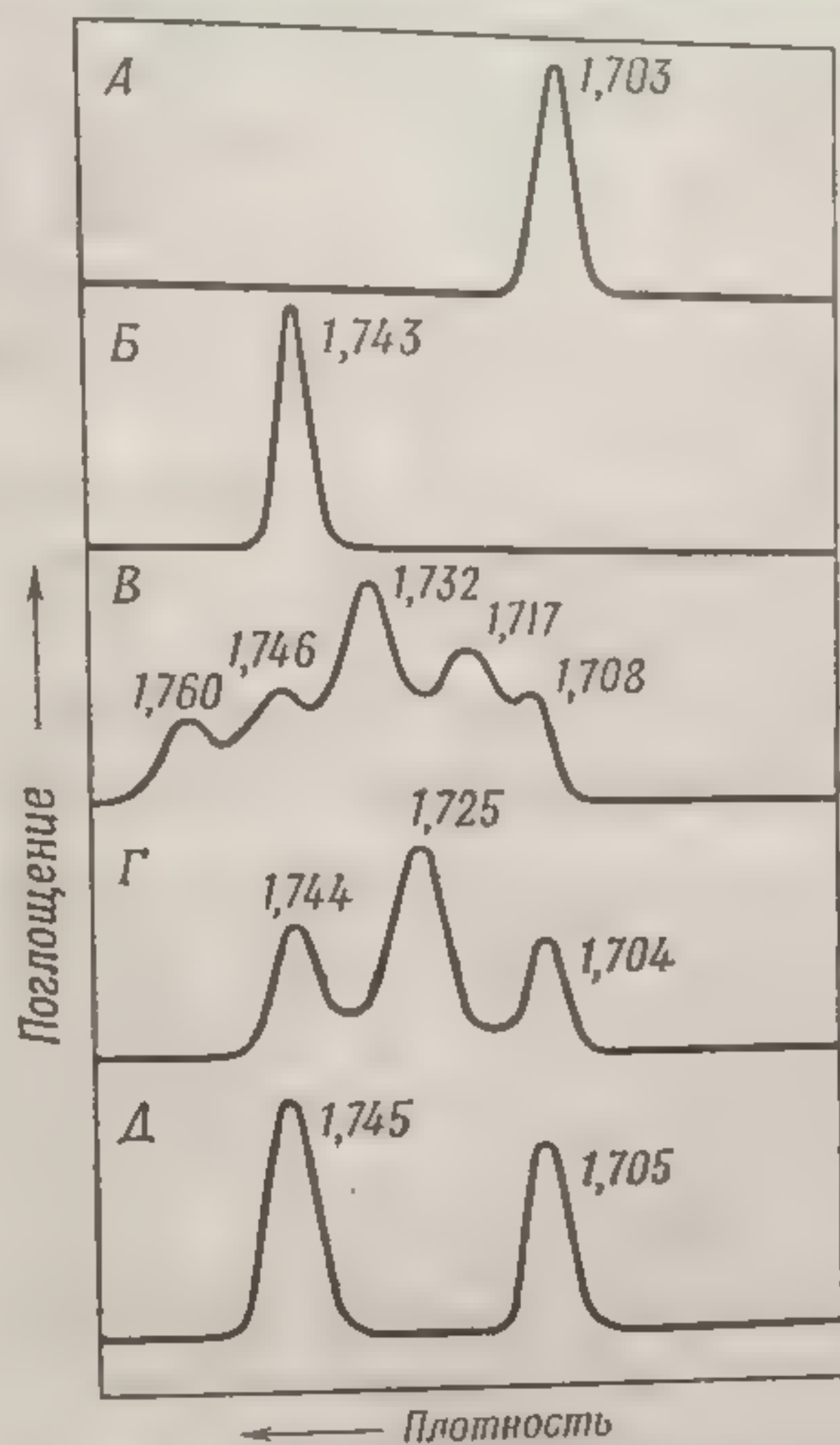
Обращение перехода спираль — клубок при образовании «ренатурированной» ДНК наблюдается лишь в том случае, когда охлаждение проводят медленно. Действительно, комплементарные цепи должны сначала найти друг друга и соединиться комплементарными участками; лишь после этого они закручиваются с образованием двойной спирали. Ход этого процесса был прослежен в опытах с двумя пробами ДНК *E. coli* — немеченой (с плотностью 1,703) и меченой N^{15} и дейтерием (с плотностью 1,743) [23]. Обе пробы смешивали, подвергали денатурации. Отжиг проводили таким образом, чтобы половина ДНК не могла претерпеть ренатурации; это сводило к минимуму неспецифическую агрегацию. При центрифугировании было получено пять слоев (фиг. 34, В), соответствующих тяжелой денатурированной ДНК (с плотностью 1,760), тяжелой ренатурированной (с плотностью 1,746), гибридной ренатурированной (с плотностью 1,732), легкой денатурированной (с плотностью 1,717) и легкой ренатурированной (с плотностью 1,708). После обработки препарата фосфодиэстеразой *E. coli* (стр. 93), которая специфически разрушает одноцепочечную ДНК, первый и четвертый слои исчезали. Оставшиеся три слоя соответствовали формам ренатурированной ДНК — тяжелой (с плотностью 1,744), гибридной (с плотностью 1,725) и легкой (с плотностью 1,704) (фиг. 34, Г). Если же две исходные пробы ДНК нагревали и ренатурировали отдельно и смешивали непосредственно перед центрифугированием, то наблюдалось появление только двух слоев ДНК (фиг. 34, Д).

Такое образование гибридной ДНК легко происходит при использовании двух видов ДНК из одного и того же источника. Однако оно может осуществляться даже между ДНК различного происхождения при условии значительного сходства между генетической информацией обеих форм, обнаруживаемого по комплементарной последовательности нуклеотидов.

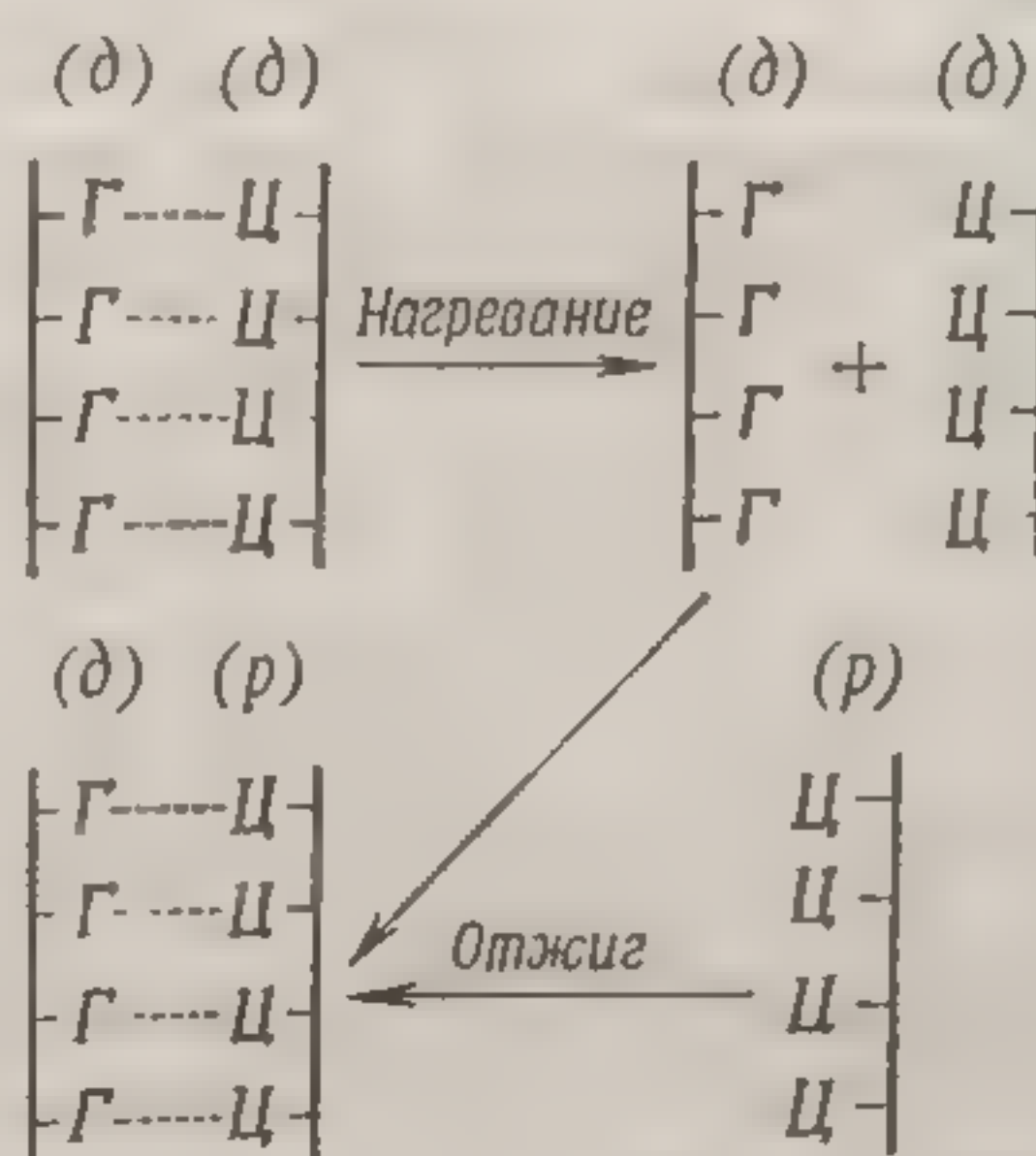
Образование гибридной формы ДНК наблюдается даже между цепями полирибонуклеотида и полидезоксирибонуклеотида [67]. Например, если полученный ферментативным путем полимер д (Г) : д (Ц) (стр. 214) нагреть до расхождения цепей и затем полученную смесь охладить в присутствии поли-р (Ц), то образуется гибридный полимер д (Г) : р (Ц). Этот гибрид состоит из соединенных водородными связями полинуклеотидных цепей, одна из которых является полирибонуклеотидной цепью, содержащей только цитозин, а вторая — полидезоксирибонуклеотидной цепью, содержащей только гуанин (фиг. 35). Образование гибридных форм имеет большое значение для изучения механизма транскрипции информации с ДНК на РНК [68] (стр. 234).

ДНК некоторых вирусов, например бактериофага SP8 (стр. 160), образуют при денатурации два компонента, имеющих различную плотность в градиенте плотности хлористого цезия [69]. Эти компоненты можно отде-

лить один от другого либо путем центрифугирования, либо при помощи хроматографии на колонках с метилированным альбумином. Цепи ДНК с большей плотностью (Н-цепь) содержат больше пиримидинов и меньше



Фиг. 34. Центрифугирование ДНК в градиенте плотности. А. Нативная легкая (немеченая) ДНК. Б. Нативная тяжелая ДНК. В. Легкая и тяжелая ДНК, нагретые и ренатурированные совместно. Г. То же, что и В, но после обработки фосфодиэстеразой. Д. После раздельной ренатурации и обработки ферментом. Подробности см. в тексте [23].



Фиг. 35. Образование гибридного полинуклеотида. Нагреванием полимера д (Г): д (Ц) вызвали разделение цепей. Затем одиночные цепи, содержащие гуанин, были нагреты вместе с одиночными цепями рибополинуклеотида, содержащего цитозин, что привело к образованию рибо-дезоксирибополинуклеотидного гибрида.

пуринов, чем более легкие цепи (Л-цепь). Если роль матрицы для образования РНК под влиянием ДНК-зависимой РНК-полимеразы выполняет нативная ДНК, то копируется только Н-цепь (стр. 236).

Последовательность нуклеотидов

Необходимость в изучении последовательности нуклеотидов вдоль цепи ДНК возникла после того, как выяснилось, что кодирование генетической информации осуществляется последовательностью расположения оснований в молекуле (стр. 314).

Проблема установления последовательности нуклеотидов в ДНК сходна с вопросом определения порядка расположения аминокислот в белках, однако решение ее представляет значительно большие трудности. Объясняется это, с одной стороны, трудностями получения из большинства природных источников однотипных молекул ДНК, а с другой — тем, что молекула ДНК представляет собой очень большой полимер, состоящий всего из 4 различных типов мономеров. Кроме того, методы, которыми исследователи располагают в этой области, еще не столь хорошо разработаны, как соответствующие методы для белков.

Первую трудность можно в известной мере преодолеть использованием ДНК из вируса ϕ X 174. Эта ДНК состоит из однотипной одноцепочечной ДНК сравнительно низкого молекулярного веса (5500 нуклеотидов). Действительно, в экспериментах с этой ДНК были получены ценные сведения о последовательности пиримидинов и пуринов [71, 83].

Методы разрушения ДНК, необходимые для определения последовательности нуклеотидов, были разработаны Чаргаффом и его сотрудниками [22, 72, 73], Бартоном [48, 74, 75, 82] и некоторыми другими авторами [76, 85]. При этом оказалось, что расщепление ДНК в кислой среде дает лучшие результаты по сравнению с регулируемым разрушением ДНК дезоксирибонуклеазой. Под действием разбавленной минеральной кислоты из молекулы ДНК удаляются пуриновые основания. Полученный в результате полимер представляет собой исходный полинуклеотид, в котором на месте пуриновых нуклеотидов находятся дезоксирибозные остатки, а пиримидиновые нуклеотиды расположены так же, как в исходной ДНК. Это соединение получило название *апуриновой кислоты*. В ходе ее образования удаление пуринов высвобождает реактивные альдегидные группы дезоксисахара со свободными гидроксильными группами при C-4'. Таким образом полимер приобретает значительную чувствительность к щелочам и к слабо щелочным буферам, содержащим первичные аминогруппы. Подобного рода разрушение ДНК достигается при использовании дифениламина в кислой среде.

Полученные описанным способом фрагменты состоят из пиримидиннуклеозиддифосфатов и ряда пиримидинолигонуклеотидов, содержащих от двух до шести и более остатков. Эти олигонуклеотидные тяжи можно разделить при помощи хроматографии на бумаге и на колонке. Таким путем была установлена частота пиримидиннуклеотидов в ДНК из ряда источников. Однако до полного выяснения строения хотя бы одной какой-нибудь ДНК еще очень далеко.

Обработка ДНК перманганатом приводит к образованию продукта (ОДНК), в котором все остатки гуанина, цитозина и тимина

окислены до уреидных групп. В результате обработки ОДНК щелочью при 100° в течение 1 час образуются компоненты типа $(\text{аденин})_n (\text{фосфат})_{n+1}$. На основании полученных таким методом данных был сделан вывод, что последовательности, состоящие из трех, четырех или пяти остатков аденина, встречаются чаще, чем это должно было бы наблюдаться при случайном распределении [85].

Изучение ближайшего соседствования в биосинтетических полинуклеотидах рассматривается в гл. XI и XII.

Химический синтез дезоксирибополинуклеотидов

Корана и его сотрудники [77—81] разработали химические методы синтеза встречающихся в природе межнуклеотидных связей между двумя нуклеотидными или нуклеозидными компонентами, используя защитное действие хлоридов дициклогексилкарбодимида или ароматического сульфонила. Таким путем были осуществлены последовательный синтез дезоксирибополинуклеотидов с заданной последовательностью нуклеотидов, а также полимеризация мононуклеотидов и предварительно полученных динуклеотидов. При этом удалось синтезировать такие соединения, как $\text{T}\phi\text{T}\phi\text{Ц}\phi\text{T}\phi\text{T}\phi\text{Ц}\phi\text{T}\phi\text{T}\phi\text{Ц}\phi\text{T}\phi\text{Ц}$ и $\text{T}\phi\text{T}\phi\text{И}\phi\text{T}\phi\text{T}\phi\text{И}\phi\text{T}\phi\text{T}\phi\text{И}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mirsky A. E., Pollister A. W., J. Gen. Physiol., 30, 117 (1946).
2. Davidson J. N., Weymouth C., Biochem., 38, 375 (1944).
3. Sevag M. G., Lackman D. B., Smolens J., J. Biol. Chem., 124, 425 (1938).
4. Kay E. R. M., Simmons N. S., Dounce A. L., J. Amer. Chem. Soc., 74, 1724 (1952).
5. Simmons N. S., Chavers S., Orbach H. K., Fed. Proc., 11, 390 (1952).
6. Kirby K. S., Biochem. J., 64, 405 (1956).
7. Kirby K. S., Biochemical Preparations, 6, 79 (1958).
8. Kirby K. S., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 3, p. 1 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1964).
9. Colowick S. P., Kaplan N. O., Methods in Enzymology, Vol. III, Section V, Articles 100 to 105 (1957).
10. Marmur J., J. Mol. Biol., 3, 208 (1961).
11. Main R. K., Wilkins M. J., Cole L. J., J. Amer. Chem. Soc., 81, 6490 (1959).
12. Bernardi G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 6, 54 (1961).
13. Kit S., Arch. Biochem. Biophys., 87, 318 (1960).
14. Klouwen H. M., Weiffenbach H., J. Chromat., 7, 45 (1962).
15. Frankel F. R., Crampton C. F., J. Biol. Chem., 237, 3200 (1962).
16. Sueoka N., Cheng T. Y., J. Mol. Biol., 4, 161 (1962).
17. Albertsson P., Arch. Biochem. Biophys., Suppl., 1, 264 (1962).

18. Nygaard A. P., Hall B. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 12, 98 (1963).
19. Chargaff E., *Experientia*, 6, 201 (1950); *Fed. Proc.*, 10, 654 (1951).
20. Elson D., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 367 (1955).
21. Chargaff E., *The Nucleic Acids*, Vol. 1, p. 307 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1955).
22. Chargaff E., *Essays on Nucleic Acids*, Amsterdam, Elsevier (1963).
23. Doty P., *Harvey Lectures*, 55, 103 (1961).
24. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.*, 4, 430 (1962).
25. Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.*, 5, 109 (1962).
26. Белозерский А. Н., Спирин А. С., *The Nucleic Acids*, Vol. 3, p. 147 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1960). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1962, стр. 123.)
27. Marmur J., *Ann. Rev. Microbiol.*, 17, 329 (1963).
28. Suoeka N., *J. Mol. Biol.*, 3, 31 (1961).
29. Schildkraut C. L., Mandel M., Levisohn S., Smith-Sonneborn J. E., Marmur J., *Nature*, 196, 795.
30. Freese E., *J. Theoret. Biol.*, 3, 82 (1962).
31. Nygaard A. P., Hall B. D., *J. Mol. Biol.* (1964).
32. Suoeka N., Cheng T. Y., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48, 1851 (1962).
33. Smith M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 10, 67 (1963).
34. Kit S., *Ann. Rev. Biochem.*, 32, 43 (1963).
35. Astbury W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1, 66 (1947).
36. Franklin R., Gosling R. G., *Nature*, 171, 740; 172, 156 (1953).
37. Wilkins M. H. F., Stokes A. R., Wilson H. R., *Nature*, 172, 759 (1953).
38. Wilkins M. H. F., *Science*, 140, 941 (1963).
39. Fuller W., *Science Progress*, 52, 26 (1964).
40. Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature*, 171, 737 and 964 (1953).
41. Feughelman M., Langridge R., Seeds W. E., Stokes A. R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Barclay R. K., Hamilton L. D., *Nature*, 175, 834 (1955).
42. Wilkins M. H. F., *Biochem. Soc. Symp.*, 14, 13 (1957); *Les Nucleoproteines*, Onzième Conseil, Institut de Chimie Solvay, Bruxelles (1959).
43. Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.*, 1, 43 (1959).
44. Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.*, 1, 37 (1959).
45. Sinsheimer R. L., *Sci. Amer.*, 207, 109 (1962).
46. Fiers W., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.*, 5, 408 and 424 (1962).
47. Friefelder D., Kleinschmidt A. K., Sinsheimer R. L., *Science*, 146, 254 (1964).
48. Burton K., *Essays in Biochemistry*, 1, 58 (P. N. Campbell and G. D. Greville, Eds.), London, Academic Press (1965).
49. Dulbecco R., Vogt M., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 236 (1963).
50. Weil R., Vinograd J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 730 (1963).
51. Dulbecco R., *Viruses, Nucleic Acids and Cancer*, p. 271, Baltimore, Williams and Wilkins.
52. Mahler H. R., Pereira A. da S., *J. Mol. Biol.*, 5, 325 (1962).
53. Kleinschmidt A. K., Lang D., Jacherts D., Zahn R. K., *Biochim. Biophys. Acta*, 61, 857 (1962).
54. Davidson P. F., Friefelder D., Heder R., Levinthal C., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47, 1123 (1961).
55. Cairns J., *J. Mol. Biol.*, 3, 756 (1961).
56. Cairns J., *J. Mol. Biol.*, 4, 407 (1962).
57. Cairns J., *Endeavour*, 22, 141 (1963).

58. Kleinschmidt A. K., Lang D., Zahn R. K., Zeit. Naturforsch., 16b, 730 (1961).
59. Perutz M. F., Proteins and Nucleic Acids, Amsterdam, Elsevier (1962).
60. Doty P., Biochem. Soc. Symp., 21, 8 (1961).
61. Marmur J., Rownd R., Schildkraut C. L., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 1, p. 231 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
62. Douzou P., Sadron C., Advances in Chemical Physics, Vol. 7, p. 339 (Ed. J. Duchesne), New York, Interscience.
63. Luzzati V., in Progress in Nucleic Acid Research (Eds. J. N. Davidson and W. E. Cohn), Vol. 1, p. 347, New York, Academic Press.
64. Jordan D. O., Ribonucleoproteins and Ribonucleic Acids, Amsterdam, Elsevier, 1960.
65. Steiner R. F., Beers R. F., Polynucleotides, Amsterdam, Elsevier, 1961.
66. Michelson A. M., The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, New York, Academic Press (1963).
67. Schildkraut C. L., Marmur J., Fresco J. R., Doty P., J. Biol. Chem., 236, PC2 (1961).
68. Spiegelman S., Sci. Amer., 210, 48 (1964).
69. Marmur J., Greenspan C. M., Science, 142, 387 (1963).
70. Cairns J., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 43 (1963).
(Синтез и структура нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1966.)
71. Hall J. B., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 6, 115 (1963).
72. Spencer J. H., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 68, 9 and 18 (1963).
73. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 91, 262 (1964).
74. Burton K., Biochem. J., 77, 547 (1960).
75. Burton K., Lunt M. R., Peterson G. B., Siebke J. C., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 27 (1963). (Синтез и структура нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1966, стр. 72.)
76. Thomas C. A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 395 (1963).
(Синтез и структура нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1966, стр. 89.)
77. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G., J. Amer. Chem. Soc., 85, 3821 (1963).
78. Schaller H., Khorana H. G., J. Amer. Chem. Soc., 85, 3828 (1963).
79. Weimann G., Schaller H., Khorana H. G., J. Amer. Chem. Soc., 85, 3835 (1963).
80. Schaller H., Khorana H. G., J. Amer. Chem. Soc., 85, 3841 (1963).
81. Khorana H. G., Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest, Chapter 5, New York, Wiley (1961).
82. Lunt M. R., Siebke J. C., Burton K., Biochem. J., 92, 27 (1964).
83. Sedat J., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 9, 489 (1964).
84. Dulbecco R., Proc. Roy. Soc. B., 160, 423 (1964).
85. Jones A. S., Walker R. T., Nature, 202, 24 and 1108 (1964).
86. Sueoka N., The Bacteria, p. 419 (I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, Eds.), p. 419 (1964).
87. Thomas C. A., MacHattie L. A., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 1297 (1964).
88. Lang D., Biochem. Biophys. Acta, 61 (1962).

ГЛАВА VI

НУКЛЕАЗЫ И РОДСТВЕННЫЕ ИМ ФЕРМЕНТЫ

Нуклеазы

Все ферменты, гидролизующие полинуклеотидные цепи, можно отнести к числу фосфодиэстераз, поскольку они разрушают фосфодиэфирные межинуклеотидные связи. Однако их легко можно разбить на две основные группы [1, 50, 52]:

1. *Эндонуклеазы*, разрушающие связи внутри цепи нуклеиновой кислоты. Под действием этих ферментов цепь распадается на фрагменты, размеры которых могут варьировать от мононуклеотидов до кислотонерастворимых полинуклеотидов. Иногда эндонуклеазы называют *нуклеодеполимеразами* или *нуклеофосфодиэстеразами*.

2. *Экзонуклеазы*, вызывающие распад полинуклеотидов путем последовательного отщепления мононуклеотидов с одного конца цепи. Обычно эти ферменты именуют просто *фосфодиэстеразами*.

Эндонуклеазы

Эндонуклеазы подразделяются на две основные группы — *рибонуклеазы*, разрушающие РНК, и *дезоксирибонуклеазы*, вызывающие распад ДНК.

Рибонуклеазы

Из различных источников были получены разнообразные формы рибонуклеаз (РНК-азы). Лучше всего изучена панкреатическая РНК-аза (РНК-аза, выделенная из поджелудочной железы).

Панкреатическая рибонуклеаза (К. Ф., 2.7.7.16¹; см. обзоры [1, 2, 3, 4])

В 1920 г. Джонс [6] обнаружил в поджелудочной железе термостабильный фермент, обладающий способностью расщеплять дрожжевую РНК. Дюбо и Томпсон [7] разработали метод очистки этого

¹ Здесь и далее этот индекс указывает положение фермента в классификации ферментов, принятой комиссией по ферментам Международного биохимического союза [5].

фермента. Кунитц [8], получивший фермент в 1940 г. в кристаллическом виде, назвал его рибонуклеазой.

Обычно рибонуклеазу выделяют из свежей бычьей поджелудочной железы. Для этого ткань поджелудочной железы экстрагируют 0,25 н. серной кислотой, охлажденной на льду. Затем добавляют сернокислый аммоний до 0,6 насыщения, переводя в осадок трипсиноген, химотрипсиноген и дезоксирибонуклеазу. Рибонуклеазу осаждают из фильтрата, повышая концентрацию сернокислого аммония до 0,8 насыщения. Путем фракционирования осаждения сернокислым аммонием можно получить рибонуклеазу в чистом виде. Полученный фермент можно перекристаллизовать из этилового спирта.

Кристаллическая рибонуклеаза, полученная вышеописанным методом Кунитца, нередко бывает загрязнена следовыми количествами протеолитических ферментов, что может привести к ошибочным результатам. Мак-Доналд [23] разработал метод получения кристаллической рибонуклеазы, совершенно свободной от примесей протеолитических ферментов.

Рибонуклеаза характеризуется устойчивостью в широких пределах рН и значительной термостабильностью в слабокислых растворах, но легко инактивируется щелочами. На ДНК рибонуклеаза не действует. Фермент обладает ярко выраженными антигенными свойствами. Максимальная активность фермента проявляется в области рН от 7,0 до 8,2 с оптимумом при рН 7,7. Температурный оптимум рибонуклеазы 65°.

Благодаря исследованиям Мура, Стейна и их сотрудников [9, 57] в настоящее время полностью выяснена последовательность аминокислот в молекуле рибонуклеазы. Изучены также активный центр молекулы и механизм ферментативного действия [10—13].

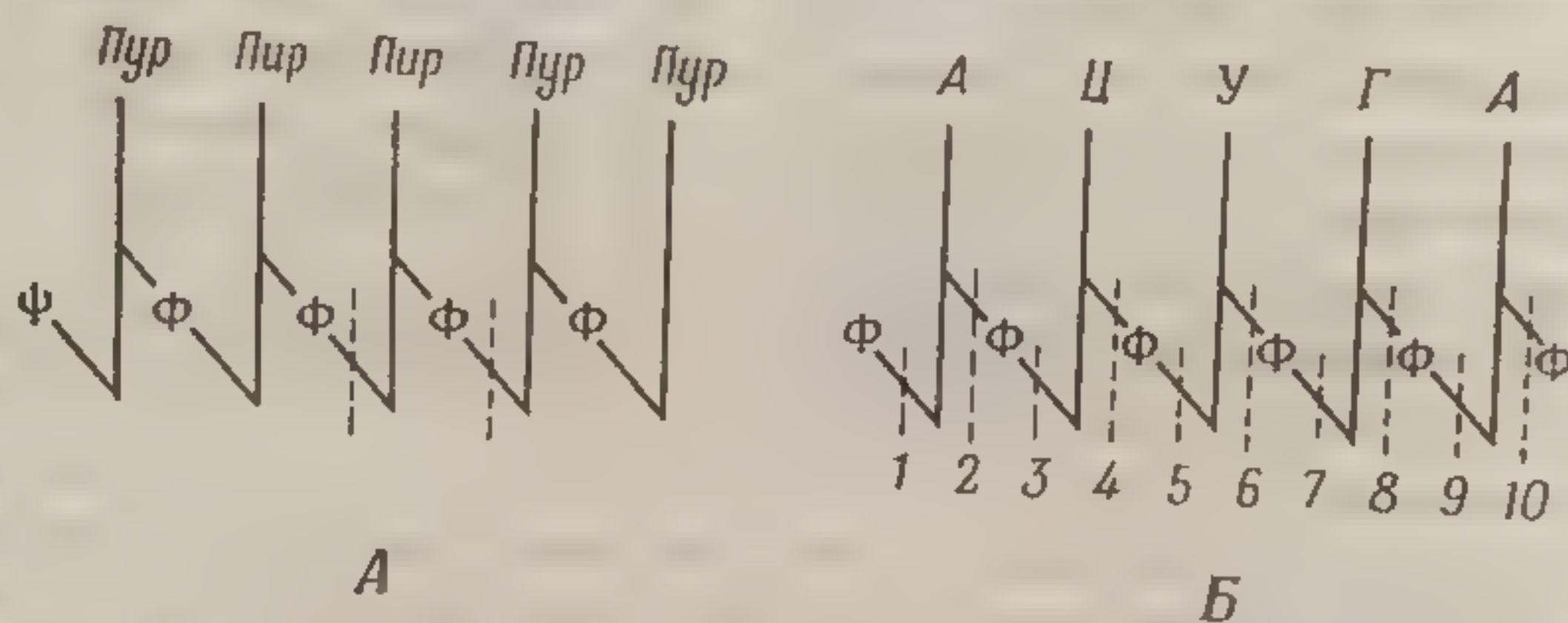
Действие рибонуклеазы направлено в основном на разрыв связи, соединяющей фосфатный остаток при С-3' в *пиримидиннуклеотиде* с С-5' следующего нуклеотида. Поэтому рибонуклеазу можно рассматривать как высокоспецифическую фосфодиэстеразу, гидролизующую только вторичные фосфорные группы пиримидиннуклеозид-3'-фосфатов. В соответствии с этим фермент может также гидролизовать циклические 2',3'-вторичные фосфаты пиримидиннуклеозидов.

Для иллюстрации действия рибонуклеазы приведем несколько характерных примеров. Изображенный на фиг. 36, А пентануклеотид, в котором символами Пур и Пир обозначены соответственно остаток пурина и пиримидина, подвергается гидролизу в местах, отмеченных пунктирными линиями. Рибонуклеотидная цепь, показанная на фиг. 36, Б, которую можно также изобразить как фАфЦфУфГфАф, разрушается в положениях 5 и 7. Таким образом, при распаде фАфЦф/Уф/ГфАф образуются фАфЦф + Уф + ГфАф.

В другом, несколько более сложном случае полинуклеотид $\text{АфЦфЦфЦфЦфАфГфГфГфУфУфУфАфГфУфЦф}$ разрушается рибонуклеазой следующим путем:

$\text{АфЦф/Цф/Цф/Цф/АфГфГфГфУф/Уф/Уф/АфГфУф/Цф}$ образует $\text{АфЦф} + \text{АфГфГфГфУф} + \text{АфГфУф} + 4\text{Цф} + 2\text{Уф}$. Таким образом, среди продуктов распада — шесть пиримидиннуклеотидов, один динуклеотид, один тринуклеотид и один пентануклеотид. В каждом из этих соединений имеется концевой пиримидиннуклеотидный остаток, связанный с С-3' предшествующего пуриннуклеотида, однако в остальном они состоят из пуриннуклеотидных остатков.

В конечном итоге действие рибонуклеазы на РНК приводит к образованию пиримидинмононуклеотидов и олигонуклеотидов,

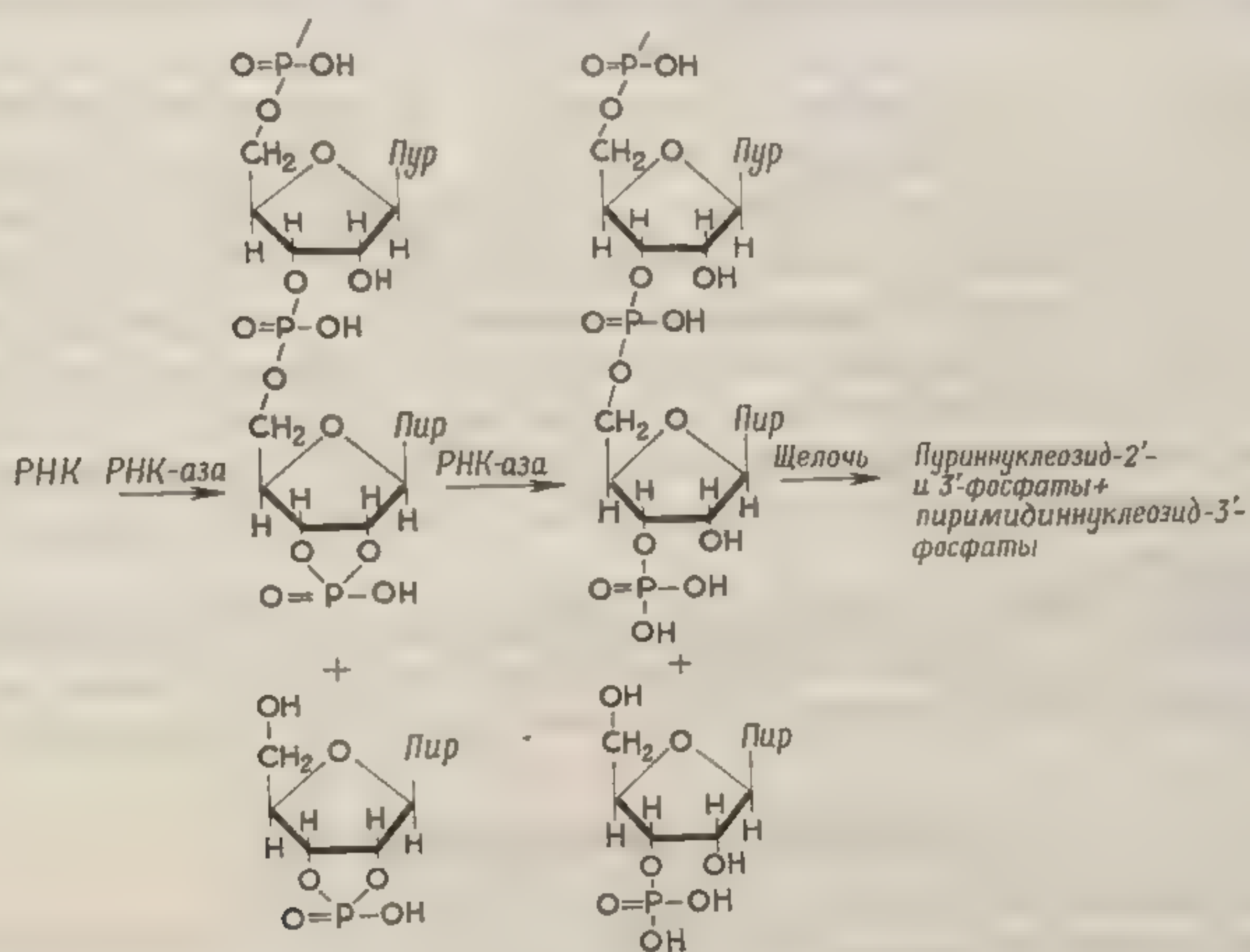


Фиг. 36. Расщепление рибонуклеазой пентануклеотида. А. Расщепление пентануклеотида, содержащего 3 пуриновых и 2 пиримидиновых нуклеотида. Расщепление происходит в местах, указанных пунктирными линиями. Б. Расщепление ферментами пентануклеотида, содержащего 2 остатка адениннуклеотида и по одному остатку цитозин-, урацил- и гуаниннуклеотида с моноэтерифицированными фосфатными остатками на каждом конце. Пентануклеотид расщепляется рибонуклеазой в положениях 5 и 7; 5'-моноэстеразой в положении 1; 3'-моноэстеразой в положении 10; диэстеразой змеиного яда в положениях 2, 4, 6 и 8; диэстеразой селезенки в положениях 3, 5, 7 и 9.

содержащих 2, 3, 4 или 5 нуклеотидных единиц. Эти олигонуклеотиды состоят из пуриннуклеотидных единиц, но заканчиваются пиримидиннуклеотидом, как в рассмотренном выше примере. Если рибонуклеаза действует на РНК в течение короткого промежутка времени, то первичными продуктами распада оказываются циклические 2',3'-фосфаты цитидина и уридина, а также олигонуклеотиды или полинуклеотиды ограниченных размеров, завершающиеся пиримидиннуклеотидом, который несет циклическую фосфорильную группу (фиг. 37) [14–16]. Эти циклические фосфаты медленно гидролизуются рибонуклеазой (фиг. 37), образуя пиримидин-3'-фосфаты либо в виде свободных нуклеотидов, либо в виде концевых нуклеотидных остатков в олигонуклеотиде. (Интересно отметить, что пурин-2',3'-фосфаты не подвергаются действию этого фермен-

та.) В результате последующей обработки олигонуклеотидов щелочью образуются пурин-2'- и пурин-3'-нуклеотиды (путем описанных ранее циклизации и расщепления), а также 3'-изомеры концевых нуклеотидов. Эти последние пиримидиннуклеотиды в щелочной среде, конечно, устойчивы; в кислоте они быстро дают равновесную смесь 2'- и 3'-фосфатов.

Рибонуклеаза разрушает также некоторые полирибонуклеотиды, образующиеся под действием полинуклеотидфосфорилазы,



Фиг. 37. Действие рибонуклеазы (РНК-азы) на РНК с образованием в качестве промежуточного продукта циклических фосфатов.

описанной в гл. XIII. Так, рибонуклеаза не действует на поли-А и поли-И (стр. 253), но вызывает распад поли-Ц и поли-У с образованием 3'-моонуклеотидов.

Действие фермента можно продемонстрировать, исходя из следующего. Известно, что под действием раствора уранилаацетата в разбавленной трихлоруксусной кислоте полностью осаждается РНК, но не продукты ее распада [17]. Рибонуклеаза переводит около половины фосфора нуклеиновой кислоты в форму, не осаждаемую ураниловым реагентом.

Ферментативную активность можно определять также спектрофотометрически [18—20], манометрически [21] или путем использования РНК, меченной P^{32} [22]. Применяемые с этой целью методы рассмотрены в обзоре Шераги и Раппеля [13].

Рибонуклеазы из других источников

Различного рода рибонуклеазы были обнаружены во многих животных тканях и в растениях [2, 3]. К числу наиболее изученных относится рибонуклеаза T_1 (К. Ф., 3.1.4.8) из такадиастазы (получаемой из культур *Aspergillus oryzae*) [24]. Этот фермент специфически гидролизует межнуклеотидные связи РНК между 3'-ГМФ и 5'-гидроксильными группами соседних нуклеотидов. Рибонуклеазы, выделенные из растений, и рибосомная рибонуклеаза из *E. coli* гидролизуют РНК до нуклеозид-3'-фосфатов [25].

Наряду с этим надосадочная фракция, получаемая при центрифугировании разрушенных клеток *E. coli*, содержит рибонуклеазу, которая гидролизует РНК до нуклеозид-5'-монофосфатов [26].

В печени крыс найдены две рибонуклеазы [54—56]. Одна из них, с оптимумом pH около 6,0, гидролизует все фосфоэфирные связи в РНК с образованием нуклеозид-2',3'-циклических фосфатов. Для другой рибонуклеазы оптимум pH лежит в области 8,0. Она гидролизует фосфодиэфирные связи только между соседними пиримидиннуклеотидами с образованием богатых пуринами олигонуклеотидов.

Следует иметь в виду, что стеклянная посуда, диализатор и другое лабораторное оборудование могут быть довольно сильно загрязнены рибонуклеазой, содержащейся в коже человека [60].

Ингибиторы рибонуклеазы

В печени крыс обнаружен белок, являющийся сильным ингибитором панкреатической РНК-азы, но при этом не действующий ни на РНК-азу T_1 , ни на растительные РНК-азы [27, 28]. Гепарин также подавляет активность панкреатической РНК-азы.

Сильным ингибитором РНК-азы является бентонит; его обычно применяют для предотвращения распада РНК в ходе ее выделения [29].

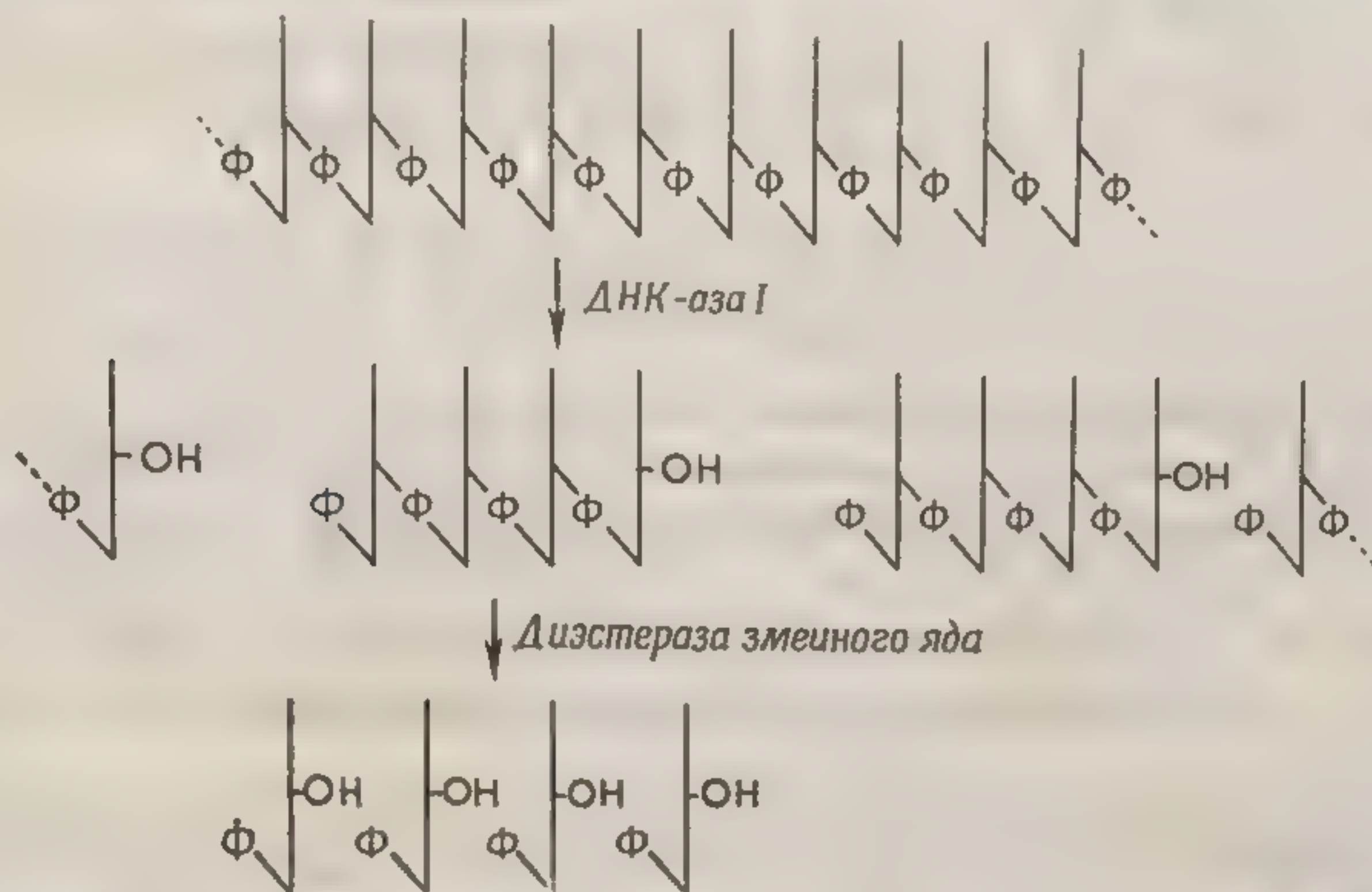
Полинуклеотидфосфорилаза

Полинуклеотидфосфорилаза может быть отнесена к деполимеразам РНК. Фермент катализирует обратимый процесс, в ходе которого полирибонуклеотид реагирует с неорганическим фосфатом; при этом образуется рибонуклеотиддифосфат. Более детально этот вопрос рассматривается в гл. XII.

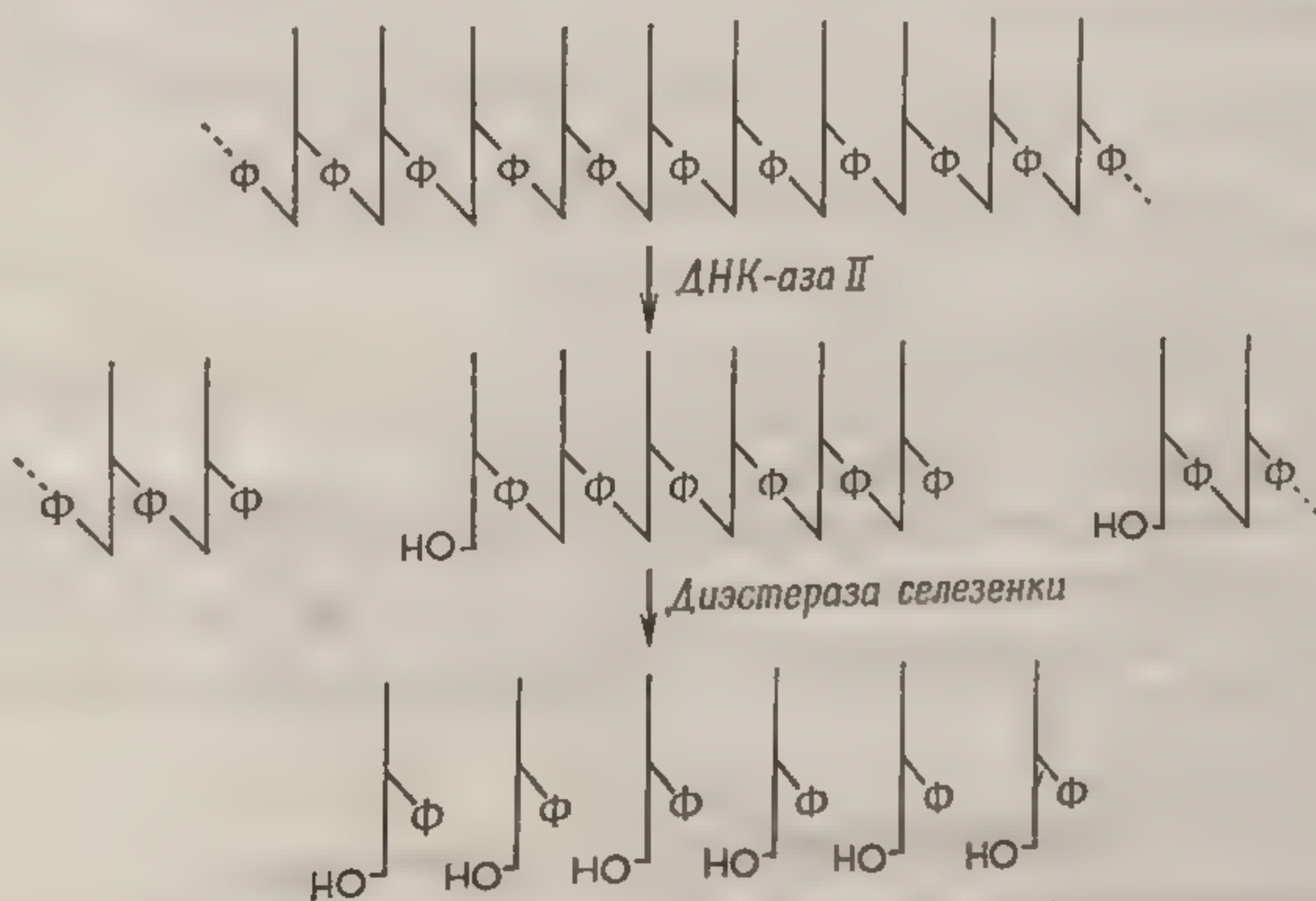
Дезоксирибонуклеазы

Из дезоксирибонуклеаз (ДНК-аз) достаточно хорошо изучены два основных типа; оба они относятся к числу эндонуклеаз.

Дезоксирибонуклеазы первого типа, примером которых может служить панкреатическая дезоксирибонуклеаза (ДНК-аза I), расщепляют ДНК до 5'-фосфомоноэфиров. В результате действия



Фиг. 38. Разрушение ДНК под действием ДНК-азы I, а затем диэстеразы змеиного яда с образованием дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфатов.



Фиг. 39. Разрушение ДНК под действием ДНК-азы II, а затем диэстеразы селезенки с образованием дезоксирибонуклеозид-3'-монофосфатов.

ферментов второго типа (ДНК-аза II), найденных в селезенке и зубной железе, образуются 3'-фосфомоноэфиры (фиг. 38 и 39).

Активность ДНК-аз можно измерять по их способности снижать вязкость натриевой соли высокомолекулярной ДНК или же

по количеству образующихся кислоторастворимых фрагментов. Последние определяют по содержанию в них фосфора или сахара или по поглощению в ультрафиолете. Для определения активности ДНК-аз можно использовать также измерение способности связывать краску, или гиперхромии. Количество кислоты, освобождающейся при гидролизе, определяют при помощи рН-стата.

Панкреатическая дезоксирибонуклеаза (К. Ф., 3.1.4.5; см. обзоры [2, 30, 31])

Под действием панкреатической дезоксирибонуклеазы (ДНК-азы I) ДНК распадается на олигонуклеотиды со средней длиной цепи в 4 единицы, со свободной гидроксильной группой в положении 3' и фосфатной группой в положении 5' (фиг. 38). Для проявления ее активности необходимо присутствие ионов магния. Фермент характеризуется щелочным оптимумом рН в области 6,8—8,2.

Метод очистки этого фермента описан в 1946 г. Мак-Карти [32]. Он предложил экстрагировать бычью поджелудочную железу 0,25 н. серной кислотой, а затем фракционировать экстракт серно-кислым аммонием в концентрации, составляющей 0,17—0,3 от насыщающей. Изменения, внесенные в этот метод Купитцем [61], дают возможность получать кристаллический препарат фермента, который был описан также Мак-Доналдом [31]. Другой ценный метод был разработан Полсоном [33]. Активность фермента повышается в присутствии ионов магния (оптимальная концентрация 0,003 М) или марганца и угнетается ионами фтора [34]. Цитрат в концентрации 0,01 М полностью подавляет деятельность фермента, активированного магнием, но не оказывает подобного действия на ДНК-азу, активированную марганцем.

Ингибирующее действие цитрата, бората и фторида на фермент осуществляется путем устранения активирующих ионов магния; такие же ингибиторы, как сульфид натрия и тиогликолевая кислота, реагируют, по-видимому, с функциональными группами ферментного белка [35].

Дезоксирибонуклеаза стрептококка

Дезоксирибонуклеаза стрептококка (стрептодорназа) относится к числу дезоксирибонуклеаз эндонуклеазного типа. Она вызывает разрыв 3'-фосфатных связей, что приводит к образованию фрагментов различной длины с концевыми 5'-фосфорильными группами. Среди продуктов распада ДНК обнаружены лишь следы мононуклеотидов и небольшое количество динуклеотидов; большинство образующихся фрагментов крупнее, чем динуклеотиды. Действие

фермента направлено преимущественно на разрыв связей ϕ Пир — ϕ Пур. Оптимальные условия для активности фермента: рН 7,0 и концентрация иона Mg^{2+} 0,02 M [36].

Дезоксирибонуклеаза II (К. Ф., 3.1.4.6; см. обзоры [2, 30])

Из селезенки и зубной железы была выделена дезоксирибонуклеаза (ДНК-аза II) с оптимумом рН в области 4,5—5,5, для проявления активности которой присутствие ионов магния не было необходимым. Фермент вызывает распад ДНК до олигонуклеотидов со средней длиной цепи в 6 единиц, содержащих свободную гидроксильную группу в положении 5' и фосфатную группу в положении 3' (фиг. 39).

Дезоксирибонуклеаза микрококков (К. Ф., 3.1.4.7)

Этот фермент, обнаруженный в культурах *Staphylococcus*, разрушает ДНК с образованием смеси нуклеозид-3'-монофосфатов и олигонуклеотидов с концевыми 3'-фосфатными группами [30]. Фермент действует преимущественно на денатурированную нагреванием ДНК, а также на РНК. Для максимальной активности фермента необходимо присутствие ионов Ca^{2+} .

РНК-ингибируемая дезоксирибонуклеаза из *E. coli* [25, 37, 38]

Этот фермент представляет собой эндонуклеазу (эндонуклеазу I *E. coli*), разрывающую цепь ДНК во многих точках с образованием смеси олигонуклеотидов со средней длиной цепи в 7 единиц, содержащих концевые 5'-фосфорильные группы. Фермент высоко-

Таблица 6

Свойства основных дезоксирибонуклеаз

	ДНК-аза I	ДНК-аза II
Субстрат	ДНК	ДНК
Оптимум рН	7—8	4—5
Активаторы	Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}	0,3 M Na^+
Ингибиторы	Цитрат, ЭДТА	Mg^{2+}
Продукты распада ДНК	Олигонуклеотиды с концевыми 5'-фосфорильными группами	Олигонуклеотиды с концевыми 3'-фосфорильными группами

специфичен для ДНК — его активность в отношении нативной ДНК в 7 раз выше, чем в отношении денатурированной ДНК. РНК подавляет действие этого фермента.

Свойства ДНК-аз двух основных типов сопоставлены в табл. 6.

Ингибиторы дезоксирибонуклеазы

Ферменты, сходные с ДНК-азой I и ДНК-азой II, обнаружены в большинстве животных тканей. Во многих тканях содержатся также ингибиторы обоих ферментов. Из них лучше всего изучены белковые ингибиторы ДНК-азы I, содержание которых особенно высоко в зобе голубя [30] и в селезенке теленка [58].

Эксонуклеазы [1, 2], или фосфодиэстеразы (К. Ф., 3.1.4.1)

Ферменты этой группы в общем вызывают распад как полирибонуклеотидов, так и полидезоксирибонуклеотидов путем последовательного удаления мононуклеотидов с одного конца цепи.

Фосфодиэстераза змеиного яда

Яды различных видов змей содержат фосфодиэстеразу, которую обычно используют для получения нуклеозид-5'-фосфатов. В природных условиях фермент этот связан с большими количествами фосфомоноэстеразы, от которой его можно отделить при помощи хроматографии и фракционирования в ацетоне [39, 40].

Диэстераза змеиного яда вызывает гидролиз РНК до нуклеозид-5'-монофосфатов (фиг. 36), начиная от 3'-гидроксильного конца цепи. Она гидролизует также олигонуклеотиды, образующиеся в результате действия дезоксирибонуклеазы I на ДНК, приводя к образованию дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатов (фиг. 38). Наличие концевых 3'-фосфорильных групп придает субстрату устойчивость.

Фосфодиэстераза селезенки

Этот фермент гидролизует РНК до нуклеозид-5'-монофосфатов (фиг. 36), начиная с 5'-гидроксильного конца цепи. Он действует также на смесь олигонуклеотидов, образующихся в результате разрушения ДНК дезоксирибонуклеазой II селезенки, расщепляя олигонуклеотиды до дезоксирибонуклеозид-3'-фосфатов (фиг. 39) [41, 53]. Фосфодиэстераза не вызывает распада олигонуклеотидов, содержащих 5'-фосфомоноэфирные концевые группы.

ДНК-специфические экзонуклеазы (фосфодиэстеразы) из *E. coli* [25, 42—46]

Эти ферменты представляют значительный интерес в общем плане. Механизм их действия детально изучен. Свойства этих ферментов приведены в табл. 7.

Таблица 7

Свойства экзонуклеаз из *E. coli*

	Экзонуклеаза I	Экзонуклеаза II	Экзонуклеаза III
Необходимые концевые группы ДНК ...фХфУфZф ...фХфУфZф	Активна Неактивна	Активна Неактивна	Активна Активна после фер- ментативного уда- ления концевого ортофосфатного остатка (Ф)
Необходимая структура ДНК	Одноцепочечная	Одно- или двух- цепочечная	Двухцепочечная
Степень разру- шения ДНК Тип воздейст- вия	До концевого ди- нуклеотида Последовательное расщепление, начиная с 3'- гидроксильного конца	Полностью Последовательное расщепление, на- чиная с 3'-гид- роксильного конца	До 40%-ного распада Последовательное расщепление, начи- ная с 3'-гидро- ксильного или фос- форильного конца
Продукты	Моно- и динукле- отиды с 5'-фос- фоэфирной груп- пой	Нуклеозид-5'-мо- нофосфаты	Неорганический ор- тофосфат, нукле- озид-5'-монофосфа- ты и крупные од- ноцепочечные оли- гонуклеотиды

Экзонуклеаза I из *E. coli* [42, 43, 59]

Фермент гидролизует денатурированную нагреванием одно-
цепочечную ДНК и почти не действует на нативную двухцепо-
чечную ДНК. Эта экзонуклеаза гидролизует цепь ДНК после-
довательно, начиная с 3'-гидроксильного конца, приводя к обра-
зованию дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфатов; это происходит
до тех пор, пока не останется лишь один динуклеотид.

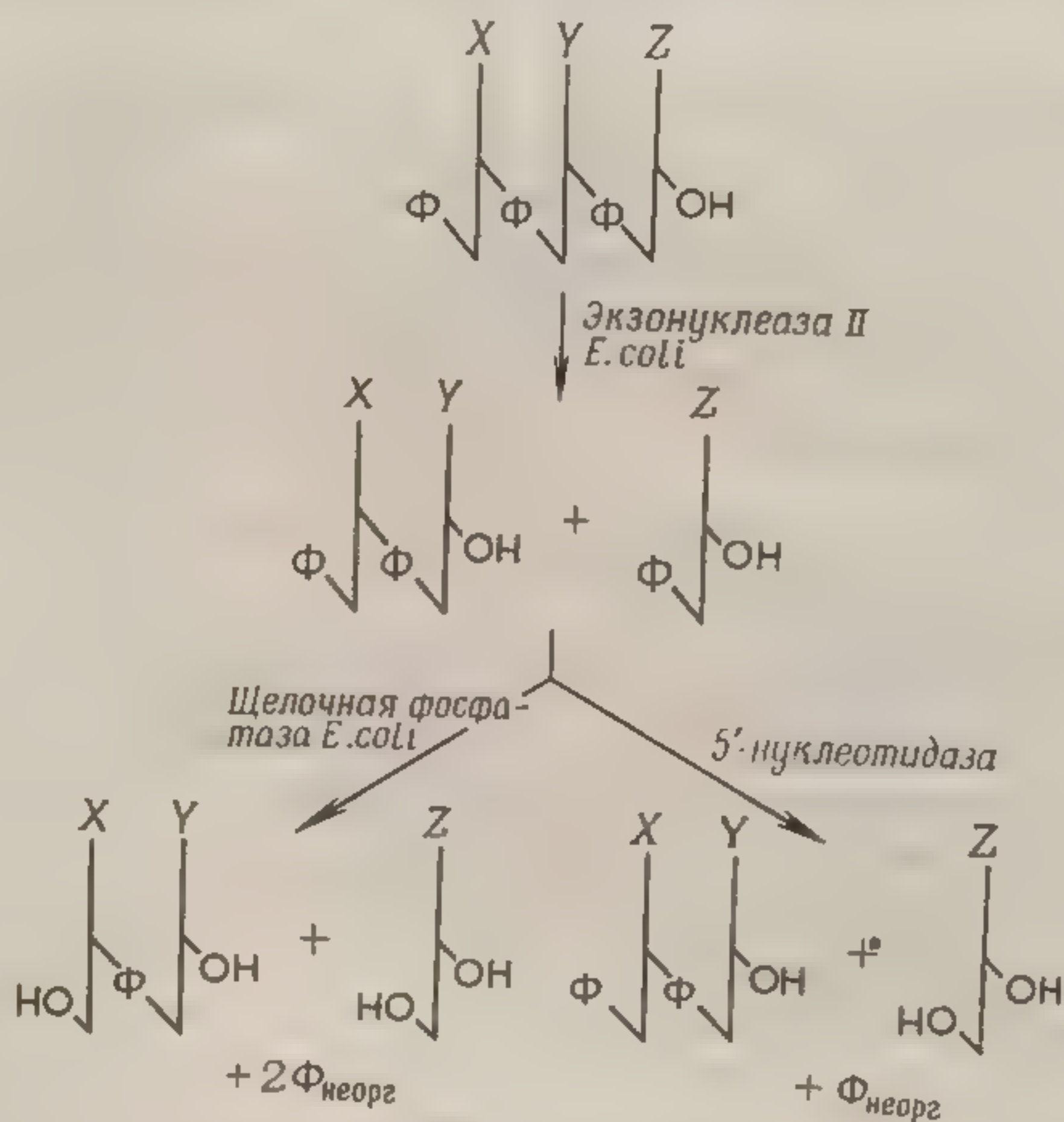
Фермент этот не вызывает распада свободных динуклеотидов
или 5'-концевых динуклеотидных фрагментов полидезоксирибо-

нуклеотидной цепи. Однако он может полностью разрушать молекулы ДНК бактериофага, содержащие гликозилированный оксиметилцитозин (стр. 157), до входящих в их состав мононуклеотидов. На полирибонуклеотиды фермент не действует.

Другие ферменты, действующие преимущественно на одноцепочечную ДНК, были найдены в печени [47, 48] и в мозгу ягненка [49].

Экзонуклеаза II из *E. coli* [44]

Экзонуклеазу II находят в наилучшем образом очищенных препаратах ДНК-полимеразы (стр. 199) из *E. coli*. Отделить ее от этого фермента не удастся.



Фиг. 40. Гидролиз олигонуклеотида экзонуклеазой II *E. coli* [44].

Подобно экзонуклеазе I, экзонуклеаза II начинает разрушение полидезоксирибонуклеотидной цепи с 3'-гидроксильного конца, освобождая последовательно дезоксирибонуклеозид-5-монофосфаты (фиг. 40). Однако в отличие от экзонуклеазы I этот фермент действует и на динуклеотиды. Так, экзонуклеаза II гидролизует олигонуклеотид фТфТфТфТфТ до 5фТ. Фермент этот быстрее действует на нативную (двухцепочечную) ДНК, чем на денатурированную (одноцепочечную) ДНК, и не разрушает олигонуклеотиды, содержащие 3'-фосфомоноэфирную группу; не действует он и на РНК.

Следующие факты подтверждают, что фермент действительно относится к числу экзонуклеаз со всеми характерными для них свойствами:

1. Полное разрушение ферментом меченного P^{32} д (А — Т)-сополимера (стр. 212) приводит к тому, что 99% P^{32} переходит в кислоторастворимую форму, представляющую собой, по-видимому, 5'-монофосфаты.

2. Частичное разрушение приводит к освобождению P^{32} в количествах, пропорциональных количеству образующихся монофосфатов.

3. Если в качестве субстрата используется д (А — Т)-сополимер, специфически меченный P^{32} -дТМФ на 3'-гидроксильном конце, то 90% меченного P^{32} материала становится кислоторастворимым, тогда как из внутренних участков цепи освобождается лишь менее 10% немеченых нуклеотидов. Это указывает на то, что действию фермента подвергается 3'-гидроксильный конец цепи.

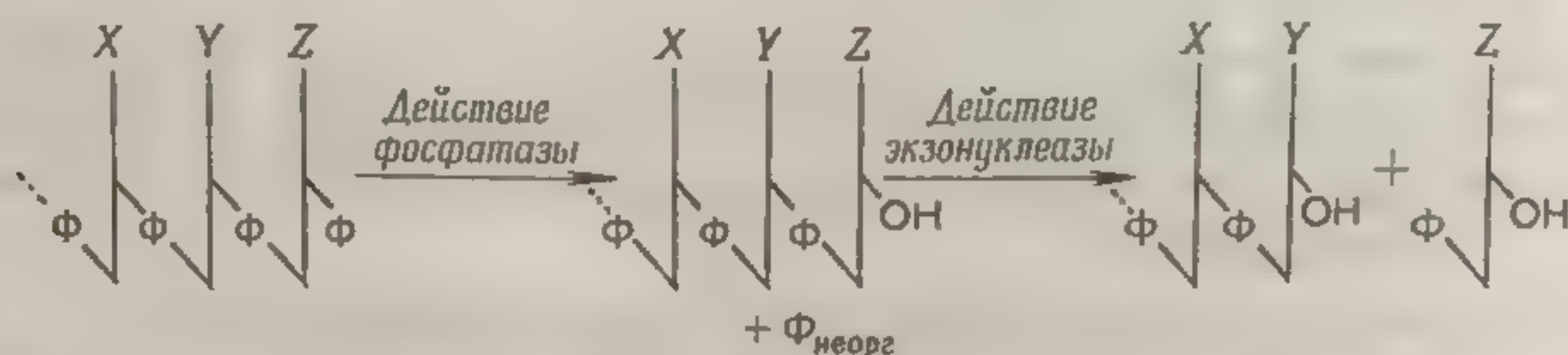
4. При обработке ДНК, обладающей трансформирующей активностью (стр. 299), ферментом из *B. subtilis* вязкость ДНК снижается на 36%, но при этом сохраняется 46% исходной трансформирующей активности. Если же гидролизующим ферментом служит экзонуклеаза (ДНК-аза I), то уменьшение вязкости ДНК на 36% сопровождается резким снижением трансформирующей активности до 0,1% первоначальной величины в результате распада цепи в критических участках.

5. При использовании в качестве субстрата меченой нативной ДНК снижение вязкости происходит быстрее, чем освобождение P^{32} -моонуклеотидов. Это свидетельствует об экзонуклеолитическом действии фермента на полинуклеотид, состоящий из двух спиралей с противоположной полярностью цепей; гидролиз начинается с освобождения двух 3'-гидроксильных групп на противоположных концах и приводит к образованию одноцепочечных форм с низкой вязкостью.

Экзонуклеаза III из *E. coli* (ДНК-фосфатаза-экзонуклеаза) [45,46]

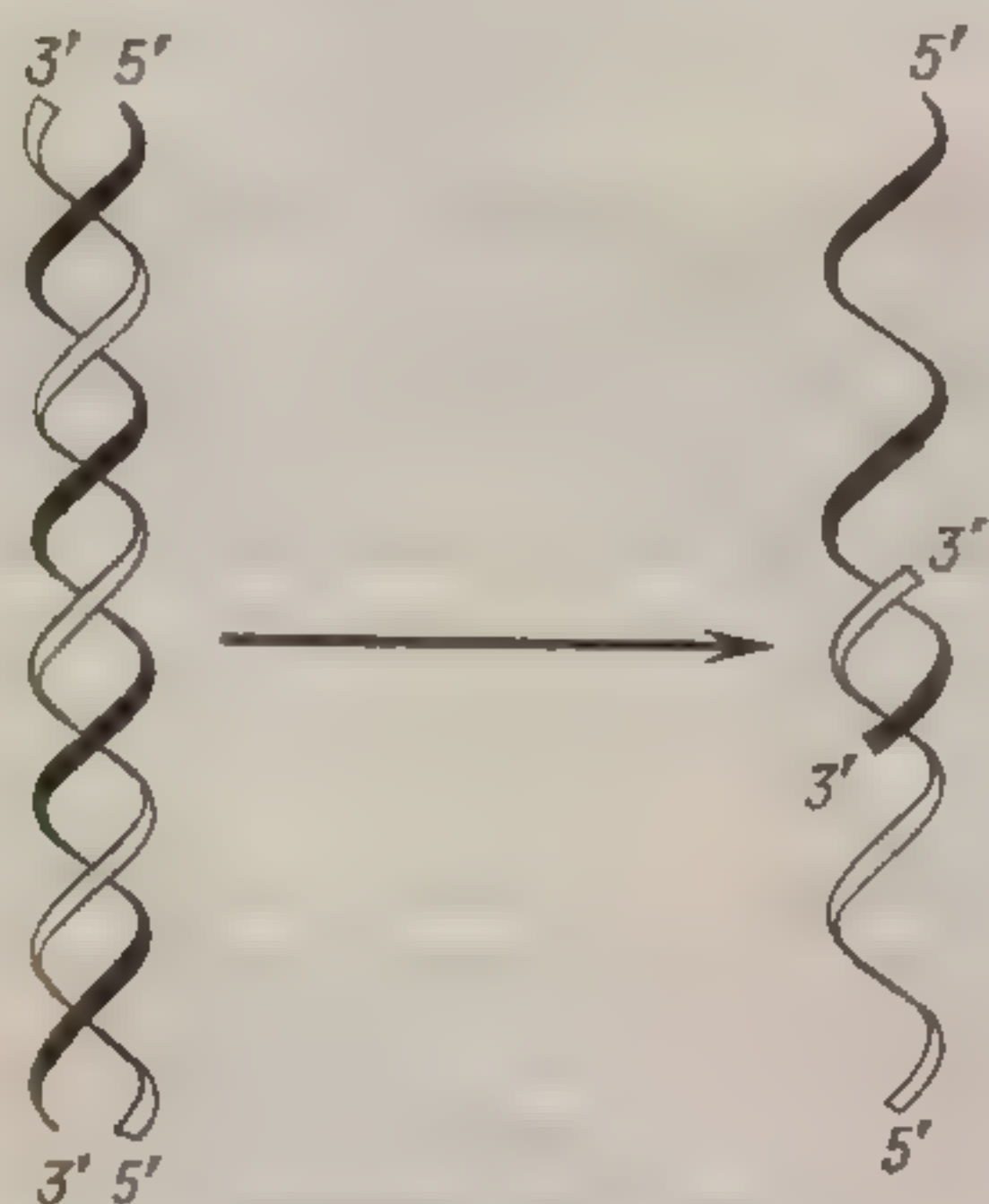
Этот фермент найден в небольших количествах, причем он тесно связан с ДНК-полимеразой *E. coli*. Разделение этих двух ферментов производится при помощи хроматографии на бумаге. Экзонуклеазное действие этого фермента весьма сходно с действием экзонуклеазы II из *E. coli*. Однако, помимо этого, экзонуклеаза III проявляет активность фосфатазы, высокоспецифичной для фосфатных остатков, этерифицированных по концевым 3'-гидроксильным группам цепи ДНК (фиг. 41). Экзонуклеаза III

не вызывает освобождения неорганического фосфата из дезоксирибонуклеозид-3'- или дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфатов,



Фиг. 41. Последовательные этапы действия экзонуклеазы III *E. coli* (ДНК-фосфатаза-экзонуклеаза) на цепь ДНК, концевой нуклеотид которой несет 3'-фосфатную группу [45].

входящих в состав олигодезоксирибонуклеотидов с короткой цепью, или из РНК с концевыми 3'-фосфорильными группами, но она разрушает ДНК с концевыми фосфорибонуклеотидами.



Фиг. 42. Механизм последовательного воздействия экзонуклеазы III *E. coli* на нативную ДНК, начиная с ее 3'-гидроксильного конца [46].

Будучи экзонуклеазой, фермент вызывает последовательное разрушение 3'-гидроксильного конца цепи ДНК с освобождением мононуклеотидов (фиг. 41). Фермент этот гидролизует только двухцепочечную ДНК, вызывая распад 35—45% исходного количества полинуклеотида. Если фермент начинает свое разрушительное действие с двух 3'-гидроксильных групп на противоположных концах двухцепочечной молекулы (фиг. 42), то после распада примерно половины исходного количества остается кислотонерастворимая ДНК. Последняя имеет одноцепочечное строение и не подвергается дальнейшему гидролизу, хотя она и чувствительна к действию экзонуклеазы I.

Короткие олигонуклеотиды, а также рибосомную РНК экзонуклеаза III не гидролизует, но она может вызвать освобождение цепи ДНК с рибонуклеозид-5'-монофосфатными концевыми группами из полинуклеотида смешанного состава.

Фосфомоноэстеразы

Ферменты этой группы вызывают выделение в виде неорганического ортофосфата концевых и моноэтерифицированных фосфатных групп из мононуклеотидов или олигонуклеотидов. 5'-Нуклео-

тидаза, полученная из семенной плазмы и змеиного яда, удаляет фосфатные группы из нуклеотид-5'-фосфатов [50]. Райграс содержит 3'-нуклеотидазу [51]. Щелочная фосфатаза из *E. coli* гидролизует разнообразные соединения, содержащие моноэтерифицированный фосфат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schmidt G., Laskowski M., The Enzymes (2nd Edition), Vol. 5, p. 3 (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck, Eds.), New York, Academic Press (1961).
2. Khorana H. G., The Enzymes (2nd Edition), Vol. 5, p. 79 (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck, Eds.), New York, Academic Press (1961).
3. Anfinsen C. B., White F. H., The Enzymes (2nd Edition), Vol. 5, p. 95 (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck, Eds.), New York, Academic Press (1961).
4. Witzel H., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 2, p. 221 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
5. Report on the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, London, Pergamon Press (1961).
6. Jones W., Amer. J. Physiol., 52, 203 (1920).
7. Dubos R. J., Thompson R. H. S., J. Biol. Chem., 124, 501 (1938).
8. Kunitz M., J. Gen. Physiol., 24, 15 (1940).
9. Smyth D. G., Stein W. H., Moore S., J. Biol. Chem., 238, 227 (1963).
10. Findlay D., Herries D. G., Mathias A. P., Rabin B. R., Ross C. A., Biochem. J., 85, 152 (1962).
11. Findlay D., Mathias A. P., Rabin B. R., Biochem. J., 85, 139 (1962).
12. Findlay D., Mathias A. P., Rabin B. R., Biochem. J., 85, 134 (1962).
13. Scheraga H. A., Rupley J. A., Advances in Enzymology, 24, 161 (1962).
14. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., 52, 552 (1952).
15. Cohn W. E., Volkin E., J. Biol. Chem., 203, 319 (1953).
16. Brown D. M., Dekker C. A., Todd A. R., J. Chem. Soc., p. 2715 (1952).
17. MacFayden D. A., J. Biol. Chem., 107, 297 (1934).
18. Crook E. M., Mathias A. P., Rabin B. R., Biochem. J., 74, 234 (1960).
19. Kunitz M., J. Biol. Chem., 164, 563 (1946).
20. Dickman S. R., Aroskar J. P., Kropf R. B., Biochim. Biophys. Acta, 21, 539 (1956).
21. Zittle C. A., Reading E. H., J. Biol. Chem., 160, 519 (1945).
22. Roth J. S., Milstein S. W., J. Biol. Chem., 196, 489 (1952).
23. McDonald M. R., Methods in Enzymology, Vol. 2, p. 427 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1955).
24. Egami F., Takahashi K., Uchida T., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 3, p. 59 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1964).
25. Lehman I. R., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 2, p. 84 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
26. Spahr P. F., Schlessinger D., J. Biol. Chem., 238, PC 2251 (1963).
27. Roth J. S., Ann. N. Y. Acad. Sci., 81, 611 (1959).
28. Shortman K., Biochim. Biophys. Acta, 55, 88 (1962).

29. Singer B., Fraenkel-Conrat H., *Virology*, 14, 59 (1961).
30. Laskowski M., *The Enzymes* (2nd Edition), Vol. 5, p. 123 (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck, Eds.), New York, Academic Press (1955).
31. McDonald M. R., *Methods in Enzymology*, Vol. 2, p. 437 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1955).
32. McCarty M., *J. Gen. Physiol.*, 29, 123 (1946).
33. Polson A., *Biochim. Biophys. Acta*, 22, 61 (1956).
34. Tamm C., Chargaff E., *Nature*, 168, 916 (1951).
35. Gilbert L. M., Overend W. G., Webb M., *Exp. Cell. Res.*, 2, 349 (1951).
36. Potter J. L., Laskowski M., *J. Biol. Chem.*, 234, 1263 (1959).
37. Lehman I. R., Roussos G. G., Pratt E. A., *J. Biol. Chem.*, 237, 819.
38. Lehman I. R., *Methods in Enzymology*, Vol. 6, p. 44 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1963).
39. Cohn W. E., Volkin E., Kny M. J. X., *Biochem. Prep.*, 5, 49 (1957).
40. Butler G. C., *Methods in Enzymology*, Vol. 2, p. 561 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1955).
41. Heppel L. A., Hilmo R. J., *Methods in Enzymology*, Vol. 2, p. 565 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1955).
42. Lehman I. R., *J. Biol. Chem.*, 235, 1479 (1960).
43. Lehman I. R., *Methods in Enzymology*, Vol. 6, p. 40 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1963).
44. Lehman I. R., Richardson C. C., *J. Biol. Chem.*, 239, 233 (1964).
45. Richardson C. C., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, 239, 242 (1964).
46. Richardson C. C., Lehman I. R., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, 239, 251 (1964).
47. Kellock M. G., Smellie R. M. S., Davidson J. N., *Biochem. J.*, 84, 112P (1962).
48. Burdon M. G., Smellie R. M. S., Davidson J. N., *Biochim. Biophys. Acta*, 91, 46 (1964).
49. Healy J. W., Stollar D., Levine L., *Methods in Enzymology*, Vol. 6, p. 49 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1963).
50. Colowick S. P., Kaplan N. O., *Methods in Enzymology*, Vol. 2, p. 427—450 and 561—570 (1955); Vol. 6, p. 40—55, New York, Academic Press (1963).
51. Shuster L., Kaplan N. B., *Methods in Enzymology*, Vol. 2, p. 551 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1955).
52. Roth J. S. (Ed.), *Enzymes of Polynucleotide Metabolism*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, Art. 3, pp. 511—804 (1959).
53. Heppel L. A., Hilmo R. J., *Methods in Enzymology*, p. 565 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1955).
54. De Lamirande G., Allard C., DaCosta H. C., Cantero A., *Science*, 119, 351 (1954).
55. Roth J. S., *J. Biol. Chem.*, 208, 180 (1954).
56. Reid E., Nides J. T., Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 618 (1959).
57. Stein W. H., *Fed. Proc.*, 23, 599 (1964).
58. Lindberg U., *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 237 (1964).
59. Lehman J. R., Nussbaum A. L., *J. Biol. Chem.*, 239, 2628 (1964).
60. Holley R. W., Apgar J., Merrill S. H., *J. Biol. Chem.*, 236, PC 42 (1961).
61. Kunitz M., *Science*, 108, 19 (1948).

Подро
в тканях
ния читат
них обзо
обзоре X
основные

Прист
кислот,
и «ДНК»
отдельны
составом
изменяет
из разли
и того ж
нии. Суп
определе
проверит
Все х
ваны на
тозы или
и пирими
ствующи
пентоз и

При
новых ки
обычно т
а затем
(в некот
рители,
ходимо
жать по
кислотор

ГЛАВА VII

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Введение

Подробное описание методов определения нуклеиновых кислот в тканях не входит в задачи настоящей книги. Такого рода описания читатель может найти в оригинальных работах или в последних обзорах [1, 2, 46—48], в частности в ценном обстоятельном обзоре Хэтчисона и Мапро [13]. Здесь же будут изложены лишь основные принципы методов.

Приступая к рассмотрению методов определения нуклеиновых кислот, важно ясно представлять себе, что термины «РНК» и «ДНК» относятся к двум классам полинуклеотидов, а не к двум отдельным химическим соединениям с известным и неизменным составом. Мы знаем, что относительное содержание оснований изменяется в широких пределах не только у нуклеиновых кислот из различных источников, но даже у нуклеиновых кислот одного и того же происхождения при различном метаболическом состоянии. Существует хорошее общее правило—после того как метод определения нуклеиновой кислоты в какой-то ткани выбран, проверить его пригодность для данного конкретного случая.

Все химические методы определения нуклеиновых кислот основаны на определении: а) фосфора, б) реакционноспособных пентозы или дезоксипентозы или их общего содержания; в) пуринов и пиримидинов. Поэтому точность этих методов ограничена существующими различиями в процентном содержании фосфора, пентоз и т. п. в нуклеиновых кислотах из разных источников.

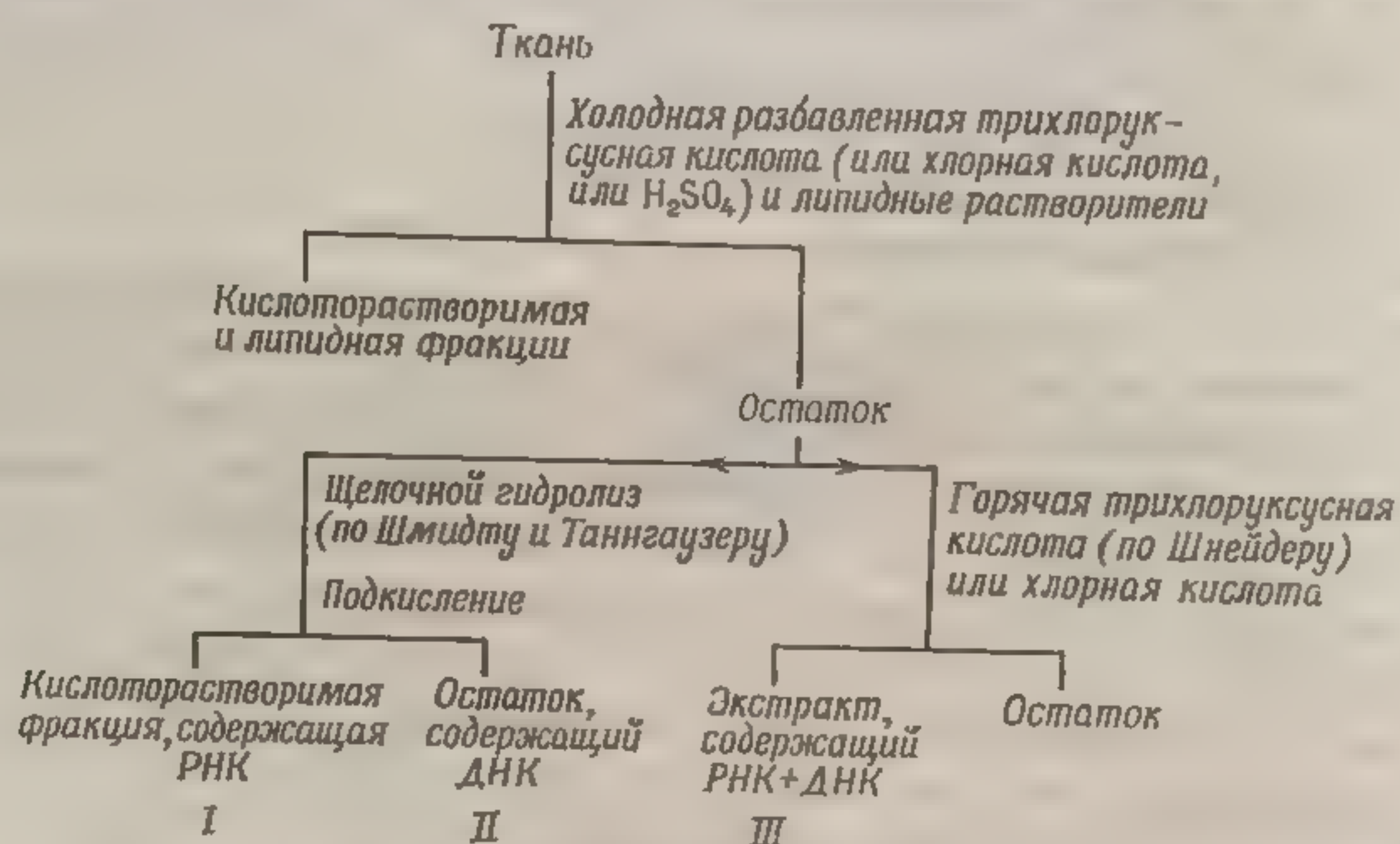
Предварительная обработка ткани

При использовании почти всех методов определения нуклеиновых кислот тонко измельченную ткань экстрагируют кислотой—обычно трихлоруксусной (ТХУ), хлорной или серной кислотой,—а затем органическими растворителями для удаления липидов (в некоторых случаях используют сначала органические растворители, а затем кислоту). При экстрагировании липидов необходимо соблюдать специальные предосторожности, чтобы избежать потерь РНК и белка [52]. Полученный остаток содержит кислотонерастворимый нелипидный фосфор, который состоит

главным образом из фосфора рибонуклеиновой кислоты и фосфора дезоксирибонуклеиновой кислоты, а также фосфора фосфопротеинов и небольших количеств других фосфорных соединений. После этого содержание РНК и ДНК определяют одним из трех основных методов.

Метод Шнейдера

По методу, предложенному Шнейдером [33], нуклеиновые кислоты экстрагируют обработкой кислотонерастворимой нелипидной фракции разбавленной ТХУ при температуре 90° в течение



Фиг. 43. Экстракция нуклеиновых кислот методом Шнейдера.

15 мин. При этом нуклеиновые кислоты разрушаются и в виде растворимых продуктов переходят в кислый экстракт (фракция III на фиг. 43). В последнем при помощи цветных реакций определяют сахара, не опасаясь искажения результатов за счет белков. «Фосфор фосфопротеидов» и другие ненуклеотидные соединения фосфора сосредоточиваются в белковом остатке. Следует отметить, что количество «фосфопротеида», определяемое этим методом, приблизительно в 10 раз превышает соответствующие данные, получаемые при использовании метода Шмидта—Таннгаузера.

Модификация метода Шнейдера включает использование хлорной кислоты вместо трихлоруксусной [34, 35].

Преимущество метода Шнейдера в его скорости и простоте. Основным недостатком метода является то, что при работе этим методом ДНК и РНК не разделяются и поэтому их можно определить только при помощи специфических цветных реакций (на пентозу и дезоксипентозу), чрезвычайно чувствительных к различным факторам.

Описаны модификации метода Шнейдера, позволяющие определять нуклеиновые кислоты в малых количествах ткани — порядка нескольких миллиграммов или даже микрограммов [39].

Метод Шмидта — Таннгаузера

По методу, предложенному Шмидтом и Таннгаузером [18], полученный после экстрагирования ткани остаток, содержащий кислотонерастворимый нелипидный фосфор, выдерживают в течение ночи в теплом разбавленном растворе щелочи. Под действием щелочи РНК расщепляется с образованием кислоторастворимых нуклеотидов, тогда как ДНК не претерпевает изменений. На этом этапе происходит отщепление неорганического фосфата от части фосфопротеидов. Затем щелочной раствор подкисляют, что приводит к выпадению в осадок ДНК и больших количеств претерпевшего деградацию белка (фракция II на фиг. 43). Содержание ДНК в осадке определяют по количеству фосфора ДНК. Кислоторастворимая надосадочная жидкость (фракция I) содержит нуклеотиды, образовавшиеся в результате распада РНК. Содержание последней определяют по количеству фосфора РНК. Фосфор фосфопротеидов (если таковые имеются) определяют путем осаждения неорганического фосфата из кислой надосадочной жидкости. Разность между содержанием неорганического фосфора и содержанием общего фосфора в этой кислой жидкости соответствует содержанию фосфора РНК. Однако, ввиду того что содержание фосфора фосфопротеидов почти во всех животных тканях составляет всего 1—3 мг на 100 г сырой ткани, большинство авторов прежних работ им вообще пренебрегало.

Основное преимущество рассматриваемого метода состоит в том, что РНК и ДНК разделяются и их содержание может быть поэтому определено по количеству либо фосфора, либо сахара, либо пурина и пиримидина. Основным недостатком метода является то, что во фракции РНК (фракция I), помимо нуклеотидов, присутствуют и другие фосфорные соединения [19, 20, 44]. Поэтому данные, основанные на определении содержания фосфора, обычно завышены. Ненуклеотидный фосфор во фракции I составляет 25% общего фосфора для печени [20] и 80% для нервной ткани [21]. К числу присутствующих во фракции I ненуклеотидных соединений относятся фосфопептиды и инозитфосфаты [22]. От примесей подобного рода нуклеотиды хорошо отделяются в чистом виде при помощи ионофореза на бумаге [20], после чего их содержание можно определить достаточно точно.

Другой недостаток метода Шмидта — Таннгаузера состоит в том, что часть ДНК, правда только в некоторых тканях, разрушается и переходит во фракцию РНК [23, 24]. Степень этого

разрушения различна для ДНК разных тканей и разных видов. Например, разрушение значительно сильнее в ткани зубной железы телят, чем в такой же ткани кролика [25]. Это явление можно ограничить (но не полностью устранить) путем подбора адекватных условий расщепления с учетом характера используемой ткани, а также путем снижения концентрации щелочи от 1 н. до 0,5 н. или даже до 0,3 н.

Определение собственно фосфора производят любым из стандартных методов — Фиске и Суббароу [26], Аллена [27], Грисуолда и др. [28] и Беренблума и Чейна [29]. При помощи двух последних методов можно исследовать очень небольшие количества тканей, например культуры фибробластов *in vitro* [30], в которых количество определяемого фосфора может быть порядка 1 мкг. Гораздо более чувствительные методы определения фосфора были описаны Норбергом [31] (минимальное количество определяемого фосфора — $0,5 \cdot 10^{-9}$ г) и Энгстрёмом [32], которому удалось определять общее содержание фосфора в одной клетке. Однако эти методы не применялись в сочетании с методом Шмидта — Таннгаузера.

Метод Огура и Розен

По методу Огура и Розен [38], предназначенному первоначально для работы с растительными тканями, прежде всего удаляют кислоторастворимые вещества и липиды. Затем выделяют РНК, обрабатывая остаток ткани 1 н. хлорной кислотой в течение 18 час при 4°. Для выделения ДНК полученный остаток обрабатывают 0,5 н. хлорной кислотой при 70° в течение 20 мин. При работе с животными тканями нагревание рекомендуется проводить до 80° в течение 30 мин в присутствии 1 н. хлорной кислоты. Содержание нуклеиновой кислоты в каждом из экстрактов определяют затем по содержанию фосфора, пентозы (или дезокси-пентозы) или пуринов и пиримидинов. Недостаток этого метода заключается в том, что некоторое количество ДНК может экстрагироваться холодной хлорной кислотой и переходить во фракцию РНК [35].

Цветные реакции на сахарные компоненты

К цветным реакциям относятся колориметрические методы, более или менее специфические для пентоз и дезокси-сахаров. Эти методы рассмотрены в обзоре Дише [3]. В общем присутствие пентозосодержащих соединений не мешает определению дезокси-пентозы, и наоборот. В то же время большинство колориметрических реакций на сахар чувствительно к белкам, и результаты определения пентозы могут быть искажены наличием фурфурола, происходящего из мукополисахаридов. Желательно поэтому до

применения колориметрических методов возможно более тщательно очищать нуклеиновые кислоты от остатков тканевых белков.

Основное затруднение при использовании всех методов подобного рода состоит в том, чтобы по количеству найденных в экстрактах реакционноспособных пентозы и дезоксирибозы рассчитать содержание ДНК или РНК. В связи с этим важно иметь в виду, что в пуриннуклеотидах сахара значительно более реакционноспособны, чем в пиримидиннуклеотидах. Для устранения указанной трудности обычно производят следующее. В очищенных препаратах РНК дрожжей или ДНК зобной железы с известным содержанием фосфора определяют содержание пентозы или дезоксирибозы. Это дает возможность при определении содержания нуклеиновых кислот в новой ткани выражать полученные результаты в величинах содержания фосфора нуклеиновых кислот. Точность результатов зависит, очевидно, от чистоты и состава использованных в качестве стандарта препаратов.

Кроме того, в качестве стандарта можно использовать чистые препараты рибозы или дезоксирибозы, а также очищенные образцы пуринрибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов.

Пиримидиновые нуклеозиды и нуклеотиды удобно восстанавливать амальгамой натрия; это дает возможность устанавливать их количество при помощи обычного колориметрического определения содержащейся в них рибозы или дезоксирибозы.

Определение пентозы

Большинство методов определения пентозы основано на освобождении фурфурола при нагревании пентозосодержащего материала с соляной кислотой. Метод Ривса и Манро [4], использованный Дэвидсоном и Уэймаусом [5] для определения РНК, состоит в растворении фурфурола в ксилоле и добавлении уксуснокислого анилина (с которым фурфурол дает соединение, окрашенное в красный цвет) или *n*-бромфенилгидразина (с которым фурфурол образует соединение желтого цвета) [45].

Однако наиболее чувствительным и наиболее широко применяемым методом определения пентоз [6] является орциновый метод, часто используемый для определения РНК. Соответствующие модификации метода подробно описаны Шнейдером [46] и Чериотти [36].

Эти методы позволяют учитывать содержание только той пентозы РНК, которая связана с пуринами. Их надежность ограничена поэтому изменениями соотношения между пуринами и пиримидинами в РНК из различных источников. Был разработан метод [8], дающий возможность определять всю связанную с основаниями пентозу, однако этот метод не нашел широкого применения.

Определение дезоксипентозы

Дезоксипентозу определяют обычно методом Дише [9], основанным на реакции сахара с дифениламином. При нагревании ДНК с дифениламином в кислом растворе образуется соединение, окрашенное в синий цвет. В реакции принимает участие сахар пурипнуклеотидов, а не пиримидиннуклеотидов. Удобная для работы модификация метода описана Дэвидсоном и Уэймаусом [10].

Значительное повышение чувствительности метода и значительное уменьшение его «отзывчивости» на присутствие других соединений достигаются добавлением ацетальдегида и осуществлением реакции в течение нескольких часов при 30° (вместо нескольких минут при 100°) [11].

Чериотти [12] описал удобную и более чувствительную цветную реакцию с индолом, которая была использована и другими авторами [13, 14].

Другой удобный, но менее употребительный метод определения дезоксипентозы основан на появлении розовой окраски при нагревании ДНК с цистеином и серной кислотой [15]. Следующий метод, при помощи которого в известных условиях можно определять дезоксипентозу как пурий-, так и пиримидиннуклеотидов, сводится к цветной реакции дезоксипентозы с триптофаном и хлорной кислотой [16].

Был описан очень тонкий флуорометрический метод, дающий возможность определять ничтожные количества ДНК — порядка $3 \cdot 10^{-9}$ г [50]. Разработан также флуорометрический метод для определения тимина в малых количествах ДНК — порядка $50 \cdot 10^{-9}$ г [49].

Определение пуринов и пиримидинов путем измерения поглощения в ультрафиолете

После того как РНК и ДНК разделены при помощи метода Шмидта—Таннгаузера или метода Огура — Розен, количество пуринов и пиримидинов, а следовательно, и количество нуклеиновых кислот в каждой фракции легко определить при помощи кварцевого спектрофотометра, измеряя поглощение в ультрафиолете [21, 38, 39]. При этом следует соблюдать некоторые меры предосторожности [41]. При проведении подобного рода измерений для экстрагирования и осаждения рекомендуется использовать хлорную кислоту, поскольку у нее поглощение в ультрафиолетовой области менее выражено, чем у трихлоруксусной кислоты (последняя характеризуется значительным поглощением в области 260 мμ).

Экспериментируя с нервной тканью, Логан, Маннелл и Росситер [21] сочетали преимущества двух методов: Шмидта — Танн-

гаузера и Шнейдера. Фракцию фосфора ДНК они выделяли по первому методу, экстрагировали ДНК горячей трихлоруксусной кислотой и определяли поглощение при 268,5 мкм. Суммарную фракцию нуклеиновых кислот выделяли методом Шнейдера и снова определяли поглощение при 268,5 мкм. Содержание РНК вычисляли по разнице между общим содержанием нуклеиновых кислот и содержанием ДНК.

Другие исследователи [38, 40] также использовали регистрацию оптической плотности в ультрафиолете вместо проведения цветных реакций или определения содержания фосфора. Они усиленно рекомендуют этот метод, ссылаясь на его быстроту, простоту и специфичность. Однако при применении рассматриваемого метода допускается произвольная величина для $\epsilon(P)$, которая пригодна не для всех нуклеиновых кислот любой данной ткани. Поглощение нуклеиновых кислот изменяется также при нагревании их с кислотой. Вместе с тем Логан и его сотрудники [21] нашли, что кривые поглощения для РНК и ДНК, взятых в одинаковых концентрациях, пересекаются в области 268,5 мкм; допускается, что при этой длине волны обе нуклеиновые кислоты характеризуются величиной $\epsilon(P)$, равной 9850.

Сама по себе ТХУ сильно поглощает ультрафиолетовые лучи, на что следует делать поправки путем специальных измерений. Этого можно избежать, пользуясь превосходной модификацией метода Шмидта — Таннгаузера, предложенной Скоттом, Фраккасторо и Тафтом [40] для определения нуклеиновых кислот в количествах порядка микрограммов в срезах тканей.

Следует подчеркнуть, что метод поглощения в ультрафиолете, разработанный школой Касперсона (стр. 123), предназначен, в сущности, для определения ничтожных количеств пуринов и пиримидинов.

Микробиологические методы

Содержание пуринов можно определять также при помощи микробиологических методов; в качестве биотеста широко применяется мутант *Neurospora*, для роста которого необходим аденин [42].

Тонкий микробиологический метод определения дезоксирибозидов и ДНК был разработан Хофф-Иоргенсенем [43], использовавшим *Thermobacterium acidophilus* R26.

Методы, применяемые в исследованиях, где используются радиоактивные изотопы

Если исследование проводится с применением радиоактивных изотопов, часто оказывается удобным разделять РНК и ДНК методом Шмидта — Таннгаузера или экстрагировать либо РНК,

либо ДНК из остатка ткани методом Шнейдера. В любом случае важно иметь в виду, что ни один из методов не обеспечивает выделения ДНК или РНК, свободных от примесей. Это обстоятельство не может серьезно повлиять на пригодность указанных методов для определения нуклеиновых кислот. Однако в исследованиях, где используются радиоактивные изотопы, эти методы нельзя применять без необходимой модификации [19, 20]. Например, основные рибонуклеотиды, полученные из РНК во фракции I (схема на фиг. 43), удобно разделять при помощи ионофореза на бумаге в форме, пригодной для определения радиоактивности.

Содержание нуклеиновых кислот в тканях

Данные о содержании нуклеиновых кислот в различных тканях, полученные с помощью химических методов, в общем под-

Таблица 8

Содержание нуклеиновых кислот в тканях
(метод Шмидта — Таннгаузера)

Ткань	Животное	Содержание фосфора на 100 г сырой ткани, мг		Отноше- ние РНК/ДНК
		РНК	ДНК	
Печень	Крыса (200—240 г)	77—110	21—25	4,0
	То же (60—80 г)	106—122	28—37	3,6
	» » (беременная самка)	110—118	21—23	5,2
	» » (эмбрион)	87—134	35—65	2,2
	Кролик	44—76	16—29	2,7
	То же (беременная самка)	67—138	14—17	6,8
	» » (эмбрион)	87—105	61—84	1,3
	Кошка	72—85	25—43	2,3
	Овца	55—84	23—33	2,5
	Человек	37—74	16—25	3,0
Поджелудоч- ная железа	Кролик	108—130	44—61	2,3
	Кошка	130—165	38—49	3,4
	Бык	170—186	21—22	8,1
	Человек (1 проба)	42	31	3,6
Почки	Крыса	25—47	33—43	0,7
	То же	20—33	15—19	1,5
Мозг	» » (200—240 г)	63—86	76—85	0,9
	» » (60—80 г)	70—82	68—78	1,0
	Кролик	67—79	81—96	0,8
	Кошка	85—151	73—94	1,4
Селезенка	Человек (1 проба)	36	77	0,5
	Крыса (200—240 г)	87—116	181—242	0,5
	То же (60—80 г)	114—135	181—261	0,6
	Кролик	89—99	181—250	0,4
Вилочковая железа	Теленок	80—100	224—250	0,4
	Человек	13—36	9—20	1,3—2,4

тверждают результаты гистологического изучения этих тканей. Перечни данных о концентрации нуклеиновых кислот обоих типов в различных тканях можно найти в многочисленных обзорах [1, 53—56]. Некоторые данные, полученные по методу Шмидта — Таннгаузера [18], сведены нами в табл. 8, причем результаты выражены в содержании фосфора нуклеиновых кислот. В табл. 9

Таблица 9

Содержание нуклеиновых кислот в нормальных тканях и злокачественных опухолях, найденное по методу Шнейдера [59]

Ткань	Животное	Содержание фосфора на 100 г сырой ткани, мг	
		РНК	ДНК
Скелетная мышца	Крыса	4,7—10,4	3,6—9,4
Сердечная мышца	»	9,6—15,3	10,8—19,7
Мозг	»	14,7—19,8	11,9—12,9
Легкие	»	11,7—24,4	46,6—80,7
Почки	»	24,9—30,2	33,1—42,6
Зобная железа	»	28,6—47,2	240—309
Селезенка	»	36,7—53,7	115—135
Поджелудочная железа	»	147—234	37,2—48,2
Печень	»	55,0—71,5	20,8—31,3
Гепатома	»	32,9—69,1	48,0—84,9
Саркома Флекснера—Джоблинга	»	35,2—64,0	47,2—62,6
Саркома Иенсена	»	47,0—59,2	52,0—75,9
Карциносаркома 256 Уокера	»	52,4—65,0	61,3—72,1
Спонтанная опухоль молочных желез	Мышь	43,4—71,7	85,5—122
Опухоль уха у мышей, вызванная действием ультрафиолетовых лучей	»	49,8—64,7	62,8—88,7
Опухоль легких	»	59,1—85,5	65,4—109

даны соответствующие величины, полученные по методу Шнейдера. Как и следовало ожидать, в органах, богатых клетками (например, селезенка, зобная железа и поджелудочная железа), отмечается высокое содержание нуклеиновой кислоты, а в органах, подобных мозгу или мышцам, концентрация этих соединений значительно ниже. Тканям с высоким ядерно-плазменным соотношением, богатым (по данным гистологического изучения) ядерным веществом, свойственна высокая концентрация ДНК. В тканях же с большим объемом цитоплазмы и общим цитоплазматическим гранул много РНК; между базофильностью цитоплазмы этих тканей и концентрацией РНК существует четкая корреляция.

Изучение любой какой-нибудь ткани у группы животных одного возраста, находящихся в одинаковых условиях, указывает, что содержание нуклеиновой кислоты может варьировать в довольно широких пределах. Обычно с возрастом содержание нуклеиновой кислоты уменьшается, однако эти изменения выражены недостаточно четко. Исключение составляют ткани зародыша, которые в общем богаче нуклеиновыми кислотами, чем соответствующие ткани взрослого животного.

Содержание нуклеиновой кислоты в опухолевых тканях колеблется в столь широких пределах, что вывести какие-то общие закономерности по этому вопросу не представляется возможным [57, 58]. Результаты некоторых определений содержания нуклеиновых кислот в опухолях включены в табл. 9. Опухоли, богатые клетками (типа саркомы), отличаются высоким содержанием нуклеиновых кислот, тогда как для опухолей, в значительной мере состоящих из фиброзной ткани (типа скirrа), характерно очень низкое содержание нуклеиновых кислот. В тех немногих случаях, когда удается непосредственно сопоставить опухолевую ткань с исходной нормальной, оказывается, что в опухоли содержание нуклеиновых кислот несколько выше.

При оценке имеющихся в литературе данных о содержании нуклеиновых кислот в тканях следует иметь в виду, что при определении фосфора РНК методом Шмидта — Таингаузера неизбежно получаются завышенные результаты, обусловленные примесью других фосфорных соединений (стр. 101).

Ткань печени

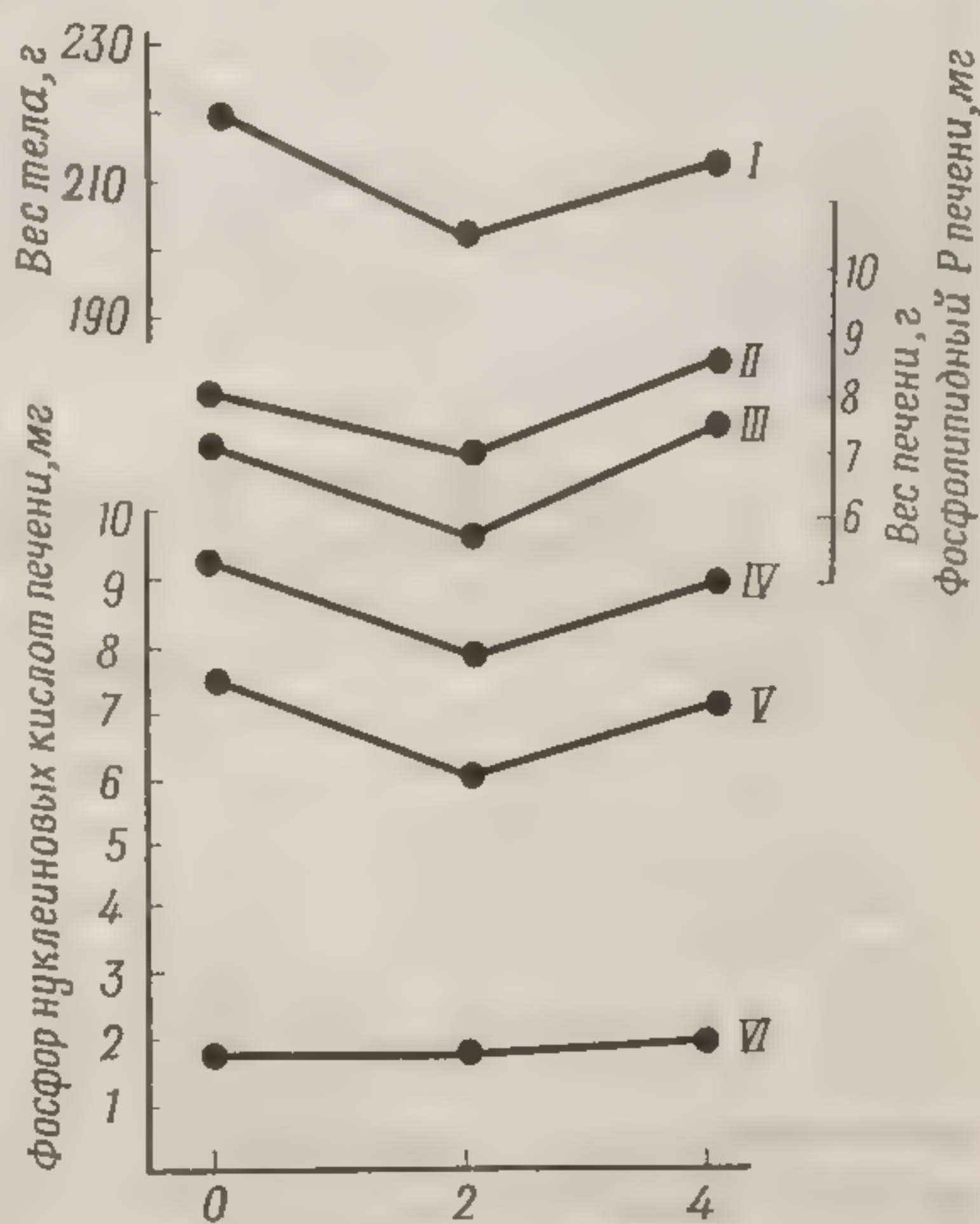
Особый интерес представляют данные, полученные при изучении печени, так как этот орган служит объектом большей части исследований, посвященных выяснению характера изменений в содержании нуклеиновых кислот под действием различных физиологических и патологических процессов. Кроме того, результаты цитологического изучения печени вполне соответствуют данным химических анализов. Голодание (фиг. 44) или выдерживание на бедном белком рационе [54] приводят к тому, что содержание РНК в печени падает, сопровождаясь исчезновением базофильных цитоплазматических гранул; содержание ДНК при этом не меняется. Подобного рода явление наблюдается при ишемии, вызванной наложением лигатуры на сосудистый пучок одной из долей печени [60].

Как хорошо видно из кривых, приведенных на фиг. 44, общее количество фосфора липидов и РНК в печени может уменьшаться или увеличиваться, но количество фосфора ДНК остается неизменным. Это вполне объяснимо, если принять, что при голодании

и последующем кормлении животных число ядер в печени и количество фосфора ДНК на 1 ядро не претерпевают изменений. Имеются все основания считать первое предположение правильным, и, как будет показано в гл. XIV, изменение условий питания не вызывает заметных изменений количества ДНК на 1 ядро в соматических клетках организма любого вида (стр. 308). ДНК оказывается действительно самым стабильным из всех клеточных компонентов.

Отсюда следует, что химический состав клетки удобно рассчитывать по отношению к ДНК [61—65]. Действительно, если содержание тех или иных веществ в ткани относить к единице ДНК, а за эту единицу принять количество ДНК в одном ядре, то становится возможным получить приблизительные средние данные о количестве каждого соединения на клетку. Необходимо подчеркнуть, что речь идет только о средних величинах. Фактическое количество того или иного вещества в одной клетке значительно варьирует в пределах ткани, особенно такой гетерогенной, как ткань печени. В ткани печени положение осложняется полиплоидией (стр. 308), наличием двуядерных клеток и межклеточной ткани (хотя на оба эти фактора можно внести поправку [65]); кроме того, помимо ядер самих печеночных клеток, в печени почти в таком же количестве присутствуют ядра клеток желчных протоков, кровеносных сосудов и купферовых клеток. Тем не менее изменения средних величин содержания исследуемого вещества в пересчете на клетку отражают реальный характер изменений состава ткани как в печени, так и в менее сложной ткани.

В табл. 10 приведены примеры использования ДНК в качестве основы для расчета количества других соединений на одну клетку, в данном случае для ткани печени у группы крыс, содержащихся



Фиг. 44. Действие двухдневного голодания с последующим двухдневным кормлением на печень группы молодых крыс-самцов [54].

I — вес тела; II — вес печени; III — фосфолипидный фосфор; IV — общий фосфор нуклеиновых кислот; V — фосфор РНК; VI — фосфор ДНК.

на различном рационе [62]. Статистический анализ данных, полученных для этой группы, показал, что различия в физиологическом состоянии или упитанности животных не сопровождаются существенными изменениями количества ДНК на ядро (или количества ДНК на печень). Отсюда следует, что число ядер на печень также остается неизменным. С другой стороны, концентрация фосфора ДНК на 100 мг ткани печени при голодании или при безбелковом питании резко повышается. Это происходит главным образом в результате уменьшения содержания липидов, белков и других веществ ткани, что приводит к увеличению числа клеток на единицу веса ткани.

Таблица 10

Среднее значение химического состава ткани печени группы альбинозных крыс, близких по весу тела

Питание	Пол	ДНК на 1 ядро, $\mu\text{г}$ *	Фосфор ДНК		Белковый азот			Фосфор РНК		
			на 100 г ткани печени, мг	на печень, мг	на 100 г ткани печени, мг	на печень, мг	на 1 $\mu\text{г}$ фосфора ДНК, $\mu\text{г}$	на 100 г ткани печени, мг	на печень, мг	на 1 $\mu\text{г}$ фосфора ДНК, $\mu\text{г}$
Полный рацион	Муж.	9,2	21,1	1,73	2380	193	116,4	91,9	4,38	4,38
72-часовое голодание	Муж.	9,1	33,4	1,63	2955	150	87,1	109,1	5,33	3,28
Безбелковая диета в течение 15 дней	Муж.	9,0	29,4	1,67	1845	108	62,3	92,2	5,22	3,16
Основной рацион	Жен.	9,7	26,9	1,77	2566	159	95,4	98,6	6,51	3,67
Основной рацион (беременность)	Жен.	9,2	24,4	1,84	2531	192	106,8	114,9	8,69	4,79

* 1 $\mu\text{г}$ (1 пикограмм) = 10^{-12} г.

Подобно этому концентрация белкового азота и фосфора РНК при голодании возрастает, хотя абсолютное количество их на печень или на единицу ДНК падает. Таким образом, при изучении состава ткани обычным способом, при котором определяют количество исследуемого компонента на единицу веса ткани, может создаться ошибочное впечатление. Пересчет данных на единицу ДНК позволяет получить картину, более близкую к истине. Другие примеры использования ДНК как основы для расчета химического состава ткани можно найти в работах Хили и др. [80], Жакоба и др. [81], Грея и Дэлука [82] и Костерлитца [64].

При безбелковом питании в печени крыс происходит равномерная убыль белка в основных цитоплазматических частицах (стр. 130), митохондриях, микросомах и клеточном соке, потеря РНК только микросомами и уменьшение количества фосфолипидов в микросомах и клеточном соке [66, 67]. Таким образом, наиболее серьезные изменения происходят в микросомах [66, 68]. Поскольку микросомы играют важную роль в белковом синтезе клетки [69, 70] (стр. 265), можно было бы думать, что белковое истощение должно сопровождаться нарушением синтеза белка. Однако Манро, Найсмит и Викраманайяке [71] в опытах с использованием радиоактивного изотопа P^{32} показали, что снижение общего количества РНК в печени, вызванное исключением белка из диеты, уравнивается повышением скорости обновления оставшихся молекул, так что общее количество синтезированной РНК остается таким же, как и прежде. От поступления белка в организм зависит количество РНК в печени, но не скорость включения P^{32} в ее молекулы; интенсивность последнего процесса определяется притоком энергии. Так, при безбелковом питании усиление притока энергии ускоряет обновление фосфора РНК, хотя общее количество РНК и белка претерпевает лишь незначительные изменения. Повышение энергетического уровня при безбелковой диете наблюдается во всех частях клетки, в том числе и в микросомах [66]. Поэтому нет оснований считать, что способность клетки печени синтезировать РНК является фактором, ограничивающим скорость белкового синтеза (стр. 288) при белковом голодании.

Во время беременности содержание РНК в печени значительно возрастает. У крысы это увеличение начинается с третьей недели беременности, а в течение первой недели лактации содержание РНК снижается почти до нормального уровня [72]. О повышении содержания РНК — при расчете на печень и на клетку — отчетливо говорят данные, приведенные в табл. 10.

Введение четыреххлористого углерода крысам, получающим безбелковую пищу или пищу, содержащую 18 или 54% казеина, вызывает увеличение содержания РНК в печени. Предполагается, что эти изменения отражают процесс образования новых клеток печени, количество цитоплазмы в которых определяется содержанием белка в пище [73].

Если хирургическим путем удалить среднюю и левую доли печени (что составляет 65—75% всего органа), то оставшиеся доли начинают быстро расти, и через 28 дней восстанавливается первоначальный вес печени. Этот процесс роста принято называть *регенерацией*, хотя правильнее было бы говорить о компенсаторной гиперплазии. В течение первых 24 час после частичной гепатэктомии масса оставшейся части печени заметно нарастает за счет увеличения размеров клеток без их деления. Наиболее актив-

ная фаза процесса регенерации наступает приблизительно на третий день после операции, когда наблюдаются особенно многочисленные митозы. Такая регенерирующая печень дает возможность сопоставить нормальную ткань взрослого животного с той же тканью в состоянии быстрого роста. В процессе регенерации содержание РНК в печени резко возрастает, достигая максимума через 1,5—3 дня после операции, т. е. в период наиболее быстрого роста, и затем резко снижаясь в период между 3- и 6-м днями после операции [74]. Подобные результаты были получены и при использовании ультрафиолетового микроскопа [75, 76]. В течение ранних этапов регенерации среднее количество ДНК на ядро значительно увеличивается [62, 77].

Изучалось также действие безбелковой пищи и диеты с высоким содержанием белка на состав регенерирующей печени. Образование РНК мало зависит от получаемого с пищей белка. Однако в регенерирующей печени крысы, выдерживавшейся на безбелковой диете, содержание РНК, по-видимому, выше, чем у крысы, получавшей пищу, богатую белками.

Печень крысы представляет собой орган, в котором легко индуцировать опухоль, скармливая животным азокраситель масляный желтый (*n*-диметиламиноазобензол). Тем самым становится возможным в известных пределах сопоставление полученной гепатомы с исходной нормальной тканью. Это сопоставление показало, что, в то время как по содержанию РНК различия между тканями обоих типов невелики, содержание ДНК выше в опухоли [62, 78]. Шнейдер [58, 79] нашел, что концентрация РНК в печени и гепатоме крыс по существу одинакова, но в гепатоме содержание нуклеиновой кислоты (на 1 мг сухой ткани) во фракции, состоящей из больших гранул (стр. 130), и в нерасфракционированном остатке, включающем микросомы (стр. 130), выше, чем в соответствующих фракциях нормальной печени. Увеличение содержания ДНК в гепатоме обусловлено главным образом возрастанием числа клеток в опухолевой ткани.

При проведении расчетов на единицу ДНК было обнаружено, что в опухолях количество белка и РНК на клетку значительно уменьшается [61, 62].

Нервная ткань

Содержание нуклеиновых кислот в *нервной ткани* определяли главным образом по методу Касперсона. Повышенная двигательная активность сопровождается снижением содержания РНК в цитоплазме клеток передних рогов спинного мозга [83]. После звукового раздражения в клетках ганглия улитки также наблюдается уменьшение содержания РНК [84]. Хиден и Хартелиус [85]

показали, что под влиянием небольших доз малонитрила содержание рибонуклеиновой кислоты в ганглиях центральной нервной системы повышается. Это наблюдение было использовано ими для лечения малонитрилом некоторых психических заболеваний.

Применение химических методов для определения содержания нуклеиновых кислот в нервной ткани осложняется присутствием значительных количеств ненуклеотидных, связанных с белком соединений фосфора, которые Росситер и его сотрудники [86] обозначают как «инозитидный Р». Например, серое вещество коры головного мозга собаки содержит $5,3 \pm 0,4$ мг фосфора ДНК на 100 г сырой ткани, $11,1 \pm 0,4$ мг фосфора РНК и наряду с этим $7,5 \pm 0,4$ мг «инозитидного Р». В седалищном нерве кошки и в ткани из мозолистого тела собаки содержание фосфора ДНК близко к таковому в сером веществе коры головного мозга, однако содержание фосфора РНК составляет всего лишь около 5 мг на 100 г ткани. Содержание «инозитидного Р» в мозолистом теле достигает 200 мг на 100 г ткани.

Разрезание или измельчение нервной ткани вызывает повышение содержания как фосфора РНК, так и фосфора ДНК, причем первого в большей степени, чем второго. Через 16 дней содержание фосфора нуклеиновых кислот достигает максимума, а затем снижается [33].

Содержание нуклеиновых кислот в бактериях

Особенно богаты нуклеиновыми кислотами бактерии, у которых содержание нуклеиновых кислот может в некоторых случаях

Таблица 11

Содержание нуклеиновых кислот в микроорганизмах

Микроорганизмы	Содержание нуклеиновых кислот, % *		
	общее содержание нуклеиновых кислот	РНК	ДНК
<i>Staphylococcus</i>	11,57	8,75	2,82
<i>Eberthella typhosa</i>	12,84	9,12	3,72
<i>Escherichia coli</i> (различные штаммы)	13,90	9,73	4,17
	13,12	8,72	4,40
	14,67	10,43	4,24
	12,37	8,59	3,78
	13,98	10,09	3,89
	15,76	11,47	4,29
<i>Bacillus aertrycke</i>	8,40	5,40	3,00
	10,64	7,00	3,64
	4,26	3,95	0,31
Дрожжи (пекарские)			

* Приведенные результаты получены в расчете на сухой вес.

достигать более 15% сухого веса бактерий. В табл. 11 приведены некоторые данные, полученные Вандрели [87] при помощи метода Шнейдера. Эти данные свидетельствуют о том, что в микроорганизмах содержатся оба типа нуклеиновых кислот, причем отношение РНК к ДНК составляет 2:1 или 3:1. Впрочем, это соотношение колеблется в широких пределах в зависимости от возраста культуры. Так, в 5-часовой культуре *E. coli* S₁ содержание ДНК и РНК составляло соответственно 15,3 и 6,1%, а в 20-часовой культуре — 8,7 и 4,4% сухого веса [88].

ЛИТЕРАТУРА

1. Leslie I., The Nucleic Acids, Vol. 2, p. 1 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1955). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1957, стр. 7.)
2. Volkin E., Cohn W. E., Methods of Biochem. Analysis (D. Glick, Ed.), 1, 287 (1954).
3. Dische Z., The Nucleic Acids, Vol. 1, p. 285 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1955). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1957, стр. 548.)
4. Reeves J. E., Munro J., Industrial and Engineering Chem. (Anal. Ed.), 12, 551 (1940).
5. Davidson J. N., Waymouth C., Biochem. J., 38, 39 (1944).
6. Meijbaum W., Hoppe-Seyler's Ztschr., 258, 117 (1939).
7. van Euler H., Hahn L., Svensk. Kem. Tidskrift, 58, 251 (1946).
8. Massart L., Hoste J., Biochim. Biophys. Acta, 1, 83 (1947).
9. Dische Z., Mikrochemie, 8, 4 (1930).
10. Davidson J. N., Waymouth C., Biochem. J., 38, 379 (1944).
11. Burton K., Biochem. J., 62, 315 (1956).
12. Ceriotti G., J. Biol. Chem., 198, 297 (1952).
13. Hutchison W. C., Munro H. N., Analyst, 86, 768 (1961).
14. Keck K., Arch. Biochem. Biophys., 63, 446 (1956).
15. Stumpf P. K., J. Biol. Chem., 169, 367 (1947).
16. Cohen S. S., J. Biol. Chem., 156, 691 (1944).
17. Gurin S., Hood D. B., J. Biol. Chem., 139, 775 (1944).
18. Schmidt G., Thannhauser S., J. Biol. Chem., 161, 83 (1945).
19. Davidson J. N., Frazer S. C., Hutchison W. C., Biochem. J., 49, 311 (1951).
20. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Biochem. J., 52, 594, 599 (1952).
21. Logan J. E., Mannell W. A., Rossiter R. J., Biochem. J., 51, 470 (1952).
22. Hutchison W. C., Crosbie G. W., Mendes C. B., McIndoe W. M., Childs M., Davidson J. N., Biochim. Biophys. Acta, 21, 44 (1956).
23. Drasher M. L., Science, 118, 181 (1953).
24. McIndoe W. M., Davidson J. N., Brit. J. Cancer, 6, 200 (1952).
25. Logan R., Davidson J. N. (unpublished results).
26. Fiske C., Subbarow Y., J. Biol. Chem., 81, 629 (1929).
27. Allen R. J. L., Biochem. J., 34, 858 (1940).
28. Griswold B. L., Humoller F. L., McIntyre A. R., Anal. Chem., 23, 192 (1951).
29. Berenblum I., Chain E., Biochem. J., 32, 286 (1938).

30. Davidson J. N., Leslie I., Weymouth C., *Biochem. J.*, 44, 5 (1949).
31. Norberg B., *Acta Physiol. Scand.*, 5 (Suppl. 14) (1942).
32. Engström A., *Acta Radiol.*, 43 (Suppl.) (1946).
33. Schneider W. C., *J. Biol. Chem.*, 161, 293 (1945).
34. Schneider W. C., Hogeboom G. H., Ross H. E., *J. Nat. Can. Inst.*, 10, 977 (1950).
35. Ogur M., Minkler S., Lindegren G., Lindegren C. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, 40, 175 (1952).
36. Ceriotti G., *J. Biol. Chem.*, 214, 59 (1955).
37. Steele R., Sfortunato T., Ottolenghi L., *J. Biol. Chem.*, 177, 231 (1948).
38. Ogur M., Rosen G., *Arch. Biochem.*, 25, 262 (1950).
39. Patterson E. K., Dackerman M. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 36, 97 (1952).
40. Scott J. F., Fraccastoro A. P., Taft E. B., *J. Histochem. Cytochem.*, 4, 1 (1956).
41. Fleck A., Munro H. N., *Biochem. Biophys. Acta*, 55, 571 (1962).
42. Loring H. S., Ordway G. L., Roll P. M., Pierce J. G., *Fed. Proc.*, 6, 510 (1947).
Loring H. S., Fairley J. L., *J. Biol. Chem.*, 172, 84 (1948).
43. Hoff-Jorgensen E., *Methods of Enzymology*, Vol. 3, p. 781 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1957).
44. Moulé Y., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 38, 175 (1956).
45. Webb J. M., *J. Biol. Chem.*, 221, 635 (1956).
46. Schneider W. C., *Methods in Enzymology*, Vol. 3, p. 680 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1957).
47. Schmidt G., *ibid.* pp. 671, 775 (1957).
48. Webb J. M., Levy H. B., *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 6, p. 1 (D. Glick, Ed.) (1958).
49. Roberts DeWayne, Friedkin M., *J. Biol. Chem.*, 233, 493 (1958).
50. Kissane J. M., Robins E., *J. Biol. Chem.*, 233, 184 (1958).
51. Haavaldsen L., Laland S., McKee J. McK., Roth E., *Biochim. Biophys. Acta*, 33, 201 (1959).
52. Hallinan T., Fleck A., Munro H. N., *Biochem. Biophys. Acta*, 68, 131 (1963).
53. Davidson J. N., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1, 77 (1947).
54. Davidson J. N., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 12, 50 (1947).
55. Schneider W. C., *J. Biol. Chem.*, 164, 747 (1946).
56. von Euler H., Hahn L., *Arch. Biochem.*, 17, 285 (1948).
57. Davidson J. N., Weymouth C., *Brit. J. Exp. Path.*, 25, 164 (1944).
58. Schneider W. C., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 12, 169 (1947).
59. Schneider W. C., Klug H. L., *Cancer Res.*, 6, 691 (1946).
60. Drochmans P., *Experientia*, 3, 421 (1947).
61. Davidson J. N., Leslie I., *Nature*, 165, 49 (1950); *Cancer Res.*, 10, 587 (1950).
62. Thomson R. Y., Heagy F. C., Hutchison W. C., Davidson J. N., *Biochem. J.*, 53, 460 (1953).
63. Mandel P., *Exposés annuels de Biochimie Medicale*, 13eme Serie (Masson et Cie, Paris) (1951).

64. K o s t e r l i t z H. W., Symposium on Liver Function, American Institute of Biological Sciences Publication, No. 4, p. 23 (1958).
65. H a r r i s o n M. F., Nature, 168, 248 (1951); Proc. Roy. Soc., B, 141, 203 (1953).
66. W i k r a m a n a y a k e T. W., H e a g y F. C., M u n r o H. N., Biochim. Biophys. Acta, 11, 566 (1953).
67. M u n r o H. N., Brit. J. Nutrit., 13, 115 (1954).
68. M u n t w y l e r E., S e i f t e r S., H a r k n e s s D. M., J. Biol. Chem., 184, 181 (1950).
69. S i e k e v i t z P., J. Biol. Chem., 195, 549 (1952).
70. Z a m e c n i k P., K e l l e r E. B., H o a g l a n d M. B., L i t t l e - f i e l d J. W., L o f t f i e l d E. B., Ciba Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism, London, Churchill, p. 161 (1956).
71. M u n r o H., N a i s m i t h D. J., W i k r a m a n a y a k e T. W., Biochem. J., 54, 198 (1953).
72. C a m p b e l l R. M., K o s t e r l i t z H. W., J. Endocrinol., 6, 171 (1949).
73. C a m p b e l l R. M., K o s t e r l i t z H. W., Brit. J. Exp. Path., 29, 149 (1948).
74. N o v i k o f f A. B., P o t t e r V. R., J. Biol. Chem., 173, 223 (1948).
75. S t o w e l l R. E., Arch. Path., 46, 164 (1948).
76. L a g e r s t e d t S., Acta Anat., Suppl IX (1949).
77. P r i c e J. M., L a i r d A. J., Cancer Res., 10, 650 (1950).
78. P r i c e J. M., M i l l e r E. C., M i l l e r J. A., J. Biol. Chem., 173, 345 (1948).
79. S c h n e i d e r W. C., Cancer Res., 6, 685 (1946).
80. H e a l y G. M., F i s c h e r D. C., P a r k e r R. C., Canad. J. Biochem. Physiol., 32, 319 (1954).
81. J a c o b M., M a n d e l L., M a n d e l P., C.R.Soc. Biol. Paris, 147, 1276 (1953); Experientia, 10, 218 (1954).
82. G r a y D. E., D e l u c a H. A., Amer. J. Physiol., 184, 301 (1956).
83. H y d é n H., Acta Physiol. Scand., 6, Suppl. (1943).
84. H a m b e r g e r C. A., H y d e n H., Acta Otolaryngol., 61, Suppl., LXI (1945).
85. H y d é n H., H a r t e l i u s H., Acta Psychiat. Neurol., Suppl., 48 (1948).
86. L o g a n J. E., M a n n e l l W. A., R o s s i t e r R. J., Biochem. J., 51, 470, 482 (1952).
87. V e n d r e l y R., Un symposium sur les proteines, Paris, Masson et Cie, p. 165 (1946).
88. B o i v i n A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12, 7 (1947); C.R. Soc. Biol. Paris, 142, 1258 (1948).

ГИСТОХИМИЯ И ЦИТОХИМИЯ

Гистохимия

Локализацию нуклеиновых кислот в отдельных клетках или срезах ткани определяют при помощи трех основных методов:

1. Окрашивание различными красителями, специфичными для РНК и ДНК. Разработано несколько методов избирательного окрашивания РНК или ДНК, например окрашивание по Фельтгену.

2. Фотографирование в ультрафиолете. Нуклеиновые кислоты столь интенсивно поглощают ультрафиолет в области 260 мкм, что при фотографировании клеток в лучах такой длины волны легко можно различить структуры, содержащие эти соединения.

3. Окрашивание после обработки специфическими ферментами. Срезы тканей изучают до и после обработки такими ферментами, как рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза.

Два первых метода можно использовать для приблизительного измерения содержания нуклеиновых кислот в отдельных частях клетки, в частности в ядре.

Нуклеальная реакция Фёльгена

Эта реакция, впервые описанная в 1924 г. Фельгеном и Рос-сенбеком [1], широко применяется гистологами и цитологами для окрашивания клеточных ядер и хромосом [2—5]. Она основана на том, что продукты частичного гидролиза дезоксирибонуклеиновой кислоты восстанавливают окраску основного фуксина, обесцвеченного сернистой кислотой (реактив Шиффа). Тканевые срезы, предварительно обезвоженные, помещают в 1 н. раствор HCl при температуре 50—60° на 4—40 мин (обычно около 10 мин). Затем срезы погружают в фуксинсернистую кислоту на 15—90 мин, промывают водой и заключают в парафин. Ядерное вещество окрашивается в фиолетовый цвет. Детальное описание метода приводится во многих работах, например в работе Томази [6].

Согласно классической интерпретации реакции Фельгена, содержащаяся в ядрах ДНК подвергается в теплой соляной кислоте частичному гидролизу. Продукты гидролиза остаются на

местах их образования и дают густое фиолетовое окрашивание. Поэтому богатые ДНК участки оказываются интенсивно окрашенными. Считается, что под действием кислоты в первую очередь разрушаются гликозидные связи сахара с пуриновыми основаниями. Воздействию подвергается 2-дезоксирибоза, связанная с основной цепочкой нуклеиновой кислоты через фосфатные группы при углеродах, находящихся в положениях 3' и 5'. Под действием кислоты значительная часть дезоксирибозы, устойчиво сохранявшей фуранозную форму, превращается в альдегид. Этот последний вступает в реакцию с реактивом Шиффа, образуя нерастворимую окрашенную макромолекулу [7—11].

Появление окраски в ходе реакции Фельгена, несомненно, обусловлено присутствием ДНК. Однако точное объяснение механизма реакции все еще является вопросом спорным. Не изучены еще и многие особенности применения этой реакции для окрашивания гистологических препаратов. Так, например, на способность ткани к окрашиванию сильное влияние может оказывать состав используемого фиксатора [12].

Очевидно также, что важное значение имеет длительность гидролиза. Если фиксатором служит жидкость Карнуа, то при оптимальном 10-минутном гидролизе удаляется половина всех оснований, по-видимому пуринов [12]. Более продолжительный гидролиз приводит к постепенному удалению из препарата ДНК, а следовательно, и к ослаблению окрашивания по Фельгену. Слишком длительный гидролиз вызывает не только распад молекул ДНК до диффундирующих продуктов, но и превращение части дезоксирибозы в ω -оксифруктоальдегид ($\text{НОСН}_2 \cdot \text{СО} \cdot \text{СН}_2 \cdot \text{СН}_2 \cdot \text{СНО}$), который образует с реактивом Фельгена растворимый и диффундирующий краситель [11].

Фотометрические измерения интенсивности окрашивания, развивающегося в срезах тканей при реакции Фельгена, послужили основой для количественного определения ДНК (стр. 123) [5, 13—19].

Ультрафиолетовая микроскопия

В 1904 г. Кёлер [20] впервые описал микроскоп, пригодный для работы с ультрафиолетовыми лучами. В этом микроскопе оптические части сделаны из плавленого кварца. Источником света служит искра, создаваемая при высоком напряжении между металлическими электродами. Нужная длина волны выделяется с помощью кварцевого монохроматора, объективы скорректированы для длины волны 275 мкм. Пользование этим прибором сопряжено с трудностями фокусировки и локализации полей зрения. Детальное описание техники его применения дано в работе Барнарда и Велча [21].

Искра высокого напряжения, получаемая от кадмиевых электродов, дает интенсивное ультрафиолетовое излучение нескольких длин волн, а именно 275 или 257 мк; при этом следует использовать соответствующим образом скорректированные объективы. Вполне подходящим источником ультрафиолетовых лучей с длиной волны 254 мк служит ртутная резонансная лампа. В этой

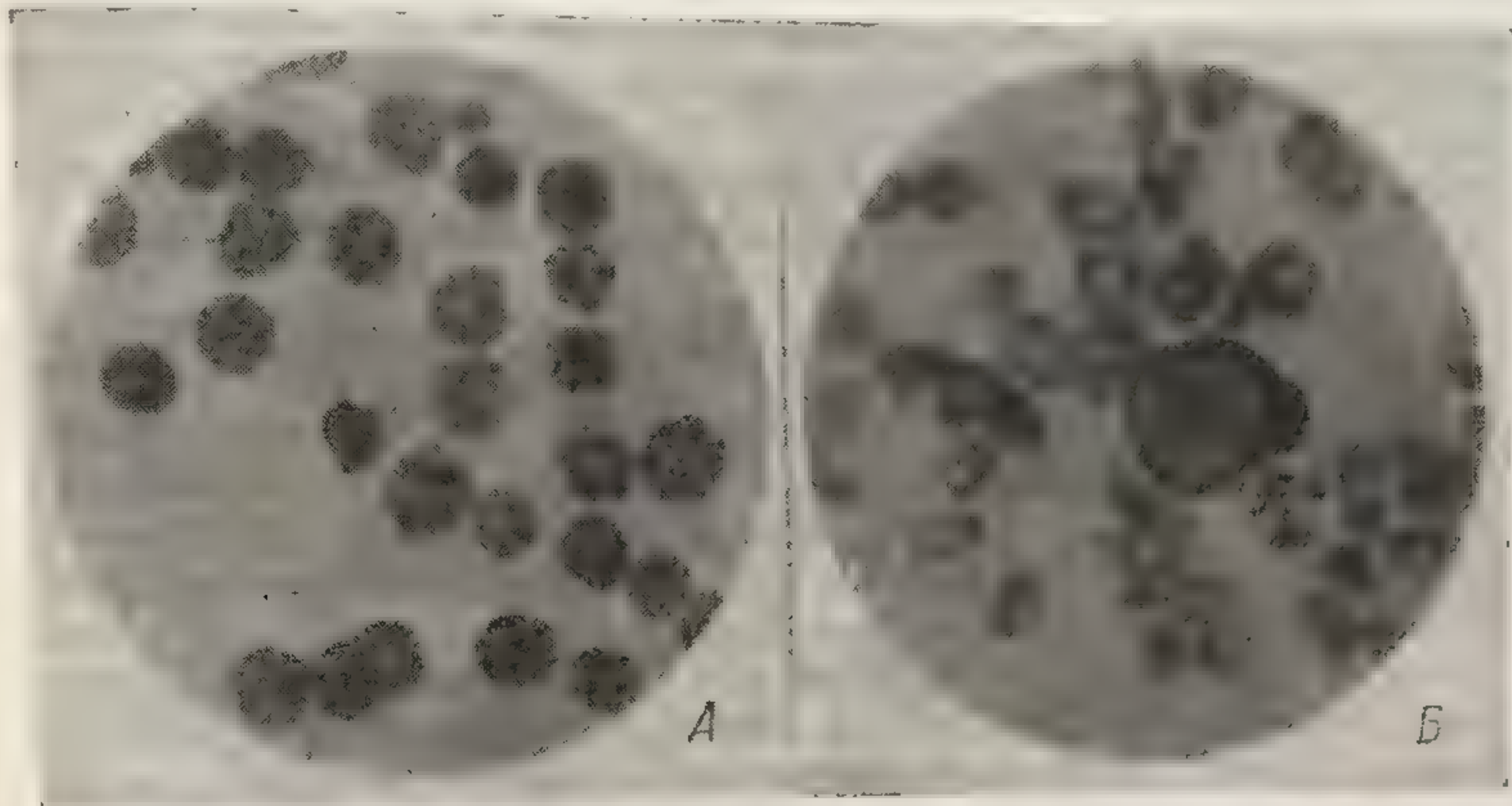


Фото 2. А. Изолированные ядра печени крысы, сфотографированные при 254 мк. Б. Мазок костного мозга в случае пернициозной анемии. Крупная клетка в центре — гемцитобласт; интенсивное поглощение обусловлено рибонуклеопротеидом в цитоплазме. Внизу, справа, — полиморфноядерный лейкоцит; видно только ядро. Фотография получена при 254 мк (Уайт, Лесли, Дэвидсон).

лампе на долю излучения с длиной волны 254 мк приходится около 85 % световой энергии. Небольшое количество испускаемых ею видимых лучей можно отфильтровать при помощи жидкого фильтра, описанного Бэкстромом, который предлагает применять для этой цели смесь растворов сернистого никеля и сернистого кобальта. Можно использовать также кварцевую призму.

Упрощенный кварцевый микроскоп подобного рода сконструирован Лавеном [22], в нем использованы микроскоп Кёлера с кварцевой спиральной резонансной ртутной лампой и фокусирование при помощи флуоресцирующего экрана.

Преимущество микроскопирования в ультрафиолетовой области спектра состоит в том, что здесь достигается большая разрешающая способность, превышающая примерно вдвое разрешающую способность обычного микроскопа. В основном ультрафиолетовая микроскопия применяется для обнаружения в ткани нуклеи-

новой кислоты. Срез изучаемой ткани помещается на кварцевую пластинку, обычно в каплю глицеринового масла. При фотографировании в ультрафиолетовых лучах богатые нуклеиновой кислотой части среза дают на позитивном отпечатке темные участки, выделяющиеся на более светлом фоне [23].

Ультрафиолетовые лучи тех длин волн, которые используются при изучении нуклеиновых кислот, весьма токсичны для живых клеток. Выдерживание живых препаратов под микроскопом дольше чем в течение нескольких секунд вызывает необратимые повреждения [24].

В качестве примера на фото 2 приведены полученные в ультрафиолетовом микроскопе микрофотографии печени крысы.

Окрашивание основными красками

Нуклеиновые кислоты как вещества с сильными кислыми свойствами обладают сродством к основным красителям — толуйдиновому синему, целестиновому голубому, пиронину, метиловому зеленому. Участки тканевых срезов, легко воспринимающие такие основные красители, получили название *базофильных*.

Одни из основных красителей, например толуйдиновый синий, окрашивают и РНК и ДНК; действие же других более избирательно. Браше [26] показал, что смесь пиронина с метиловым зеленым [25], называемая красителем Унна — Паппенгейма, окрашивает РНК (пиронином) в красный цвет, а ДНК (метиловым зеленым) — в зеленый цвет [28].

Окрашивание метиловым зеленым обусловлено наличием ДНК в высокополимерном состоянии. Эта реакция была положена в основу количественного микроспектрофотометрического определения ДНК [29].

Для изучения нуклеиновых кислот можно использовать также флуорохромные красители [30].

Рибонуклеазная проба

Возможность изучения распределения нуклеиновых кислот в тканевых срезах при помощи фермента рибонуклеазы в сочетании с основными красителями, например красителем Унна — Паппенгейма, была впервые установлена Браше [26, 31] в 1940 г. В первых своих исследованиях он применял неочищенные препараты рибонуклеазы. В настоящее время принято пользоваться для этой цели только кристаллическими препаратами ферментов, свободными от примесей протеаз.

Как показал Браше, после инкубирования тканевых срезов в водном растворе рибонуклеазы базофильные гранулы клеточной

цитоплазмы теряют способность удерживать пиронин. Хроматин же клеточных ядер продолжает окрашиваться метиловым зеленым. Исходя из этого, Браше заключил, что РНК локализована главным образом в базофильных цитоплазматических гранулах (стр. 130). Таким же способом можно доказать присутствие РНК в ядрышке.

Рибонуклеазную пробу можно, конечно, использовать при работе с любым подходящим основным красителем. Этот метод применялся многими авторами для обнаружения РНК в различных тканях [28, 29, 31—37]. Браше [38] рекомендует проводить определение следующим образом. Ткань фиксируют в реактиве Ценкера, содержащем 5% уксусной кислоты, или в жидкости Серра (спирт — формалин — уксусная кислота) и обычным путем заключают в парафин. Полученные затем срезы переносят в воду и выдерживают в течение 1 час при температуре 37° в дистиллированной воде с рН 6, содержащей 0,1 мг кристаллической рибонуклеазы в 1 мл. Одновременно контрольные срезы выдерживают в воде, не содержащей фермента. Затем срезы окрашивают в течение 20 мин в смеси следующего состава:

Метиловый зеленый — 0,15 г

Пиронин В — 0,25 г

Спирт (95°) — 2,5 мл

Ацетатный буфер (рН 4,2) — до 100 мл

После этого срезы быстро промывают дистиллированной водой, дифференцируют в 95-градусном спирте в течение 5—10 мин и заключают. Применяется также окрашивание 2%-ным водным раствором толудинового синего в течение 20 мин.

Применение рассматриваемого метода вызвало ряд возражений [39]. В первую очередь отмечали невозможность гарантировать абсолютную чистоту фермента; указывалось также, что проникновению его в ткань может препятствовать, например, наличие мономолекулярного слоя белка. Если последний аргумент справедлив, то отрицательные результаты рибонуклеазной пробы еще не доказывают отсутствия РНК и лишь положительные результаты можно считать доказательством ее наличия. Первое возражение возникло в связи с данными о том, что многие препараты кристаллической рибонуклеазы, приготовленные по методу Кунитца, загрязнены следами протеолитических ферментов, которые могут оказывать заметное действие на тканевые срезы. Однако и при использовании свободной от протеаз кристаллической рибонуклеазы [40] были получены сходные результаты [37]. По-видимому, рибонуклеазную пробу все же можно использовать для обнаружения РНК, но к оценке результатов следует подходить с известной осторожностью.

Дезоксирибонуклеазная проба

Аналогичный метод использования дезоксирибонуклеазы вместо рибонуклеазы применялся лишь немногими авторами. Этот метод позволяет удалять ДНК из хромосом [37, 41], ядер нервных клеток [28] и ткани печени [42, 43].

Под действием дезоксирибонуклеазы хромосомы и клеточные ядра теряют вещество, поглощающее ультрафиолетовые лучи и окрашиваемое метиловым зеленым или целестиновым голубым, и теряют способность окрашиваться по Фельгену [8]. Дезоксирибонуклеаза действует только на фиксированные препараты, но не на ядра свежей ткани [44].

Гистохимические методы в сочетании с ультрафиолетовой микрофотографией

Обычно метод Браше (рибонуклеазную пробу) применяют в сочетании с окрашиванием ткани основными красками. Но этот метод с равным успехом можно использовать и в сочетании с микрофотографией [33]. Таким путем можно убедиться в том, что инкубирование ткани с рибонуклеазой приводит к удалению из цитоплазматических гранул клеток печени какого-то вещества, по-видимому РНК, поглощающего ультрафиолетовые лучи.

Другие методы удаления нуклеиновых кислот

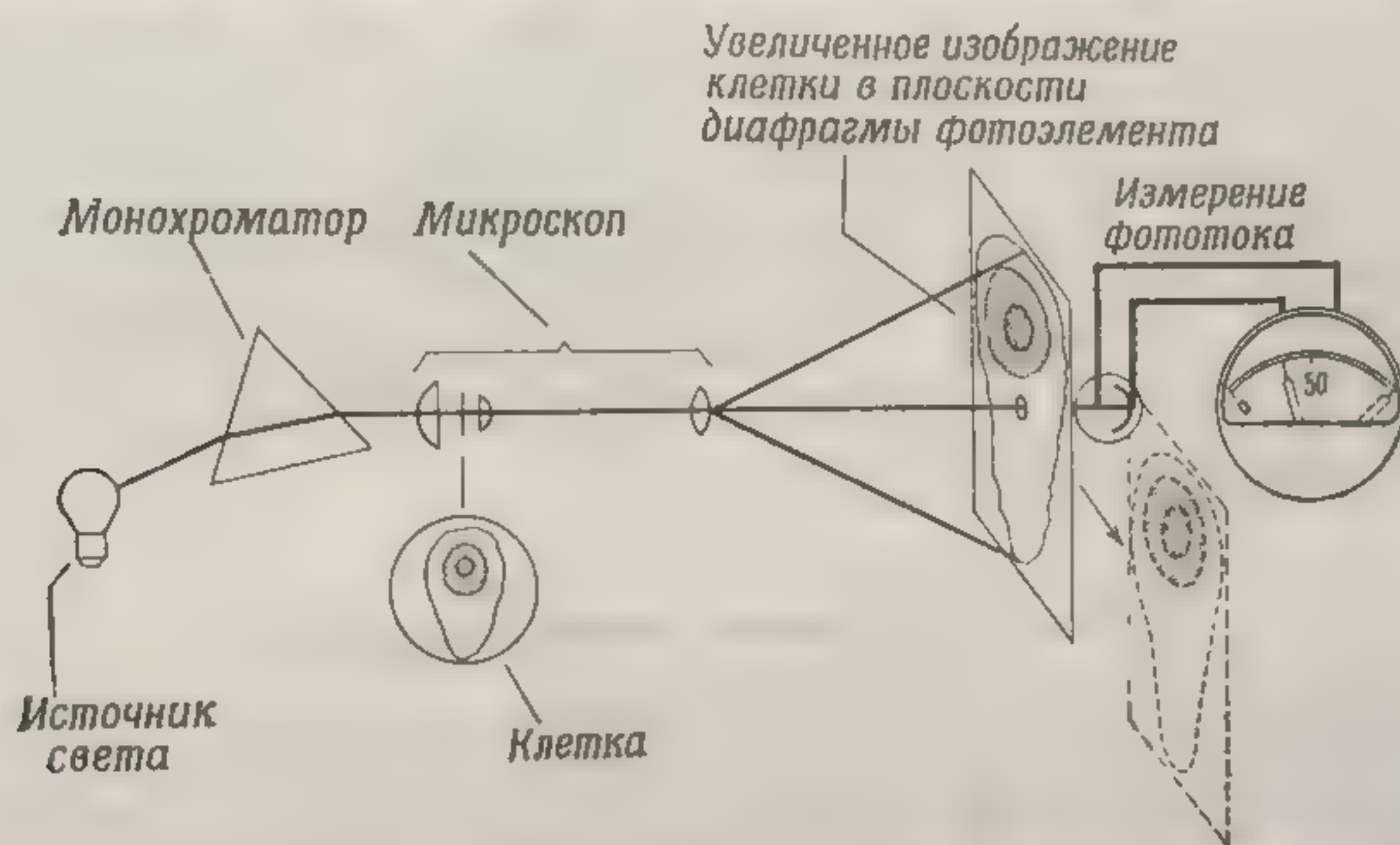
Для удаления РНК из тканевых срезов Поллистер и Рис [236] употребляют не рибонуклеазу, а 0,3 *M* раствор трихлоруксусной кислоты, в котором срезы выдерживаются при температуре 90° в течение 15 мин. Этот способ воздействия, основанный на аналитическом методе Шнейдера (стр. 100), не нарушает целостность клеточных структур в тканевых срезах или цитологических препаратах. Фотометрически определяют поглощение изучаемой структуры в лучах с длиной волны 254 мμ. Затем нуклеиновую кислоту удаляют горячей трихлоруксусной кислотой, после чего вновь измеряют поглощение. Разность в величинах поглощения соответствует поглощению, обусловленному присутствием нуклеиновой кислоты. Это позволяет рассчитать количество нуклеиновой кислоты. Удаление РНК из гистологических препаратов может быть достигнуто также обработкой их холодной хлорной кислотой [44—46], 0,1 н. раствором КОН [47] или горячей 1 н. HCl [48].

Цитохимическим методам определения нуклеиновых кислот посвящен ряд обзоров [3, 4, 39, 49—51].

Количественная цитофотометрия

Для определения ничтожных количеств нуклеиновых кислот в тканях может быть использована ультрафиолетовая спектрофотометрия. Однако, прежде чем перейти к рассмотрению этого метода, уместно остановиться на более общей проблеме количественной микроспектрофотометрии [52].

Основной принцип работы микроспектрофотометра схематически изображен на фиг. 45. Если используется видимый свет, то



Фиг. 45. Принцип действия фотоэлектрического микроспектрофотометра [53].

срезы исследуемой ткани помещают на предметное стекло и окрашивают методом, специфичным для данного клеточного компонента. Например, реакция Фельгена (стр. 117) или окрашивание метиловым зеленым (стр. 120) являются реакциями, специфичными для ДНК. Спектрофотометрические измерения могут с успехом использоваться только при условии, что количество удерживаемого тканью красителя пропорционально количеству изучаемого клеточного компонента. Пробу, например окрашенный срез ткани, помещают под микроскоп, освещенный монохроматическим светом от подходящего источника. Микроскоп фокусирует свет на определенный участок исследуемой клетки. Увеличенное изображение этого участка проектируют на фотоэлемент и измеряют возникающий в нем ток. Затем объект сдвигают таким образом, чтобы получить отсчет с неокрашенного участка препарата. Этот второй отсчет величины тока превышает первый, поскольку с пути светового луча удален поглощающий материал. Если известны размеры пробы, то количество поглощающего материала можно рассчитать по разнице указанных двух результатов измерения тока.

Прямые фотоэлектрические измерения можно заменить фотографированием препарата в видимых или ультрафиолетовых лучах. О концентрации исследуемого клеточного компонента можно при этом судить по плотности изображения на фотографической пластинке, измеряемой фотоэлектрическим денситометром.

Зеркальный микроскоп имеет ряд преимуществ по сравнению с обычными зеркальными приборами, применяющимися при микроспектрофотометрии, поскольку он может быть использован при свете любой длины волны [54, 55].

Микроспектрофотометрию в видимом свете широко использовали Мирский [56], а также Поллистер с сотрудниками [16, 57—59]. При помощи этого метода им удавалось, например, измерять количество ДНК в отдельном клеточном ядре, окрашенном по Фельгену (стр. 117). Применение микроспектрофотометрии в цитологии значительно облегчается использованием таких приборов, как самопишущий микроспектрофотометр и интегрирующий микроденситометр [60—62].

Ультрафиолетовая цитофотометрия

Принципы количественной цитофотометрии могут быть использованы и при облучении объекта ультрафиолетом. В этом случае применяется кварцевый или зеркальный микроскоп. Если по поглощению ультрафиолетовых лучей определяют количество нуклеиновых кислот в данном участке клетки, то предварительного окрашивания пробы не проводят.

Метод количественной цитофотометрии был разработан и усовершенствован Касперсоном и его сотрудниками в Стокгольме [53, 63—66]. Аппаратура, применявшаяся этими исследователями, чрезвычайно сложна. Для ознакомления с деталями ее конструкции следует обратиться к оригинальным работам.

Предложенный Касперсоном прибор позволяет измерять общее количество материала, поглощающего в ультрафиолете, но он не дает возможности отличать друг от друга свободные пуриновые или пиримидиновые основания, нуклеозиды, нуклеотиды и полинуклеотиды. Не удастся также провести различия между РНК и ДНК, так как оба вещества поглощают ультрафиолетовые лучи в равной мере. Поэтому Касперсон и его сотрудники для разграничения между РНК и ДНК применяют абсорбционный метод в сочетании с окрашиванием по Фельгену (стр. 117).

Ультрафиолетовой спектрофотометрии посвящено несколько обзоров [3, 4, 66—69]. Метод применялся для измерения количества РНК в нервной ткани [74] и ДНК в клеточных ядрах [70—73].

Инфракрасная спектрофотометрия

Как указывалось выше, спектр поглощения РНК и ДНК в ультрафиолетовой области идентичен. Что же касается их спектров поглощения в инфракрасной области, то они имеют характерные различия [75, 76, 237]. Однако этот факт не был сколько-нибудь широко использован.

Цитохимия

Как уже отмечалось в гл. I, нуклеиновые кислоты были открыты при изучении химического состава клеточного ядра. Представление о том, что нуклеиновые кислоты в основном являются компонентами ядра, так или иначе признавалось до тридцатых годов. Впервые оно было серьезно поколеблено в 1938 г., когда Беренсу при помощи сложных и трудоемких методов удалось разделить растительные ткани на ядерную и цитоплазматическую фракции и показать, что последняя содержит значительное количество РНК. Оно было окончательно опровергнуто результатами, полученными при помощи только что описанных гистохимических методов. В 1938 г. Касперсон и Шульц [77] показали, что цитоплазма некоторых быстро размножающихся клеток богата веществом, интенсивно поглощающим в ультрафиолете и дающим характерную для нуклеиновых кислот кривую поглощения. На основании того, что это вещество не окрашивается по Фельгену, оно было идентифицировано как РНК. При помощи гистохимической рибонуклеазной пробы было подтверждено наличие РНК в цитоплазме. Окончательно вопрос был решен путем выделения РНК из цитоплазматической фракции, свободной от следов ядерного материала.

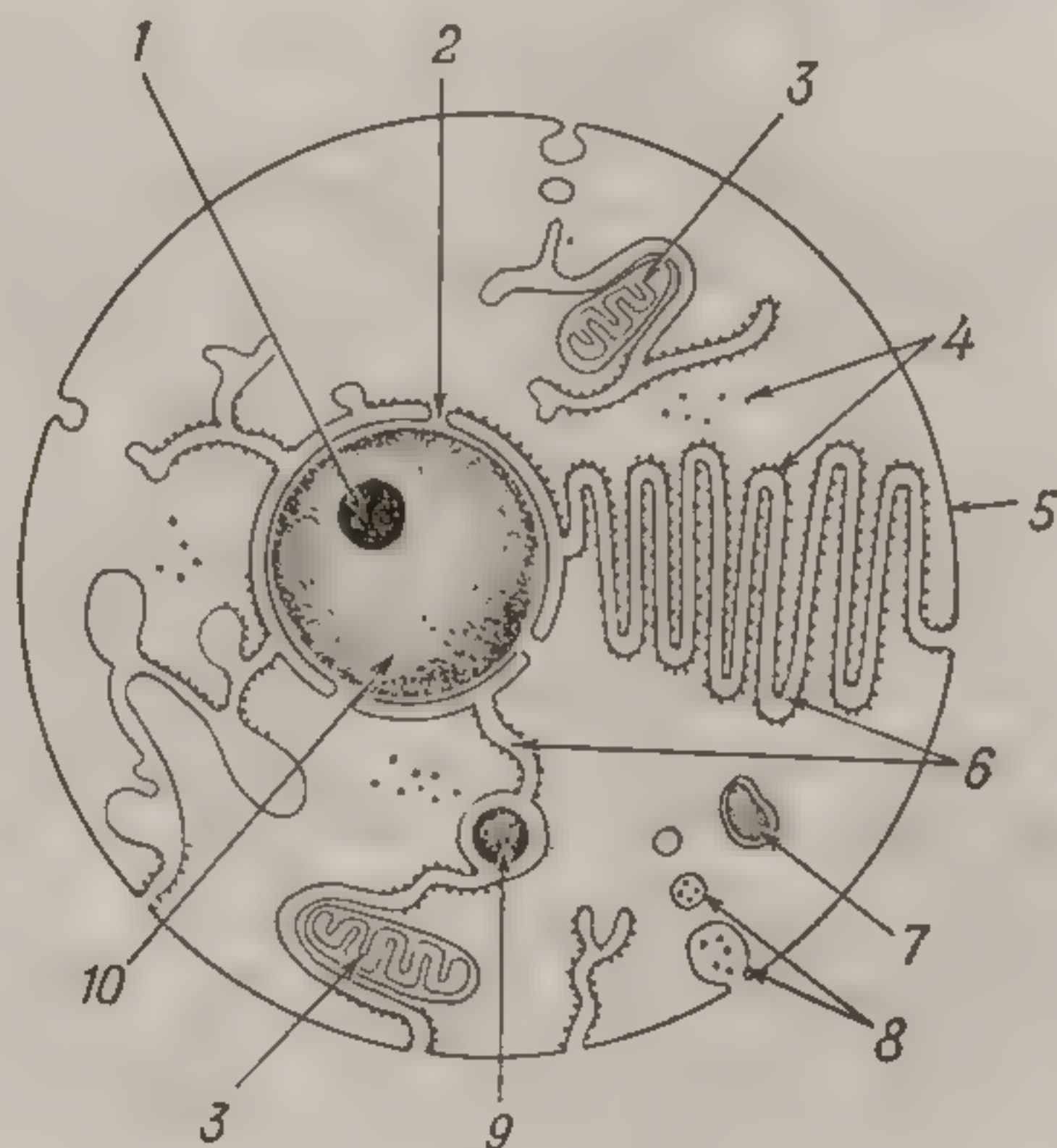
Основные сведения из области цитологии

На дальнейшее развитие биохимии РНК большое влияние оказали успехи цитологии. В связи с этим обсуждению роли РНК в жизни клетки необходимо предпослать краткий очерк некоторых современных представлений о строении цитоплазмы.

На фиг. 46 схематически изображено строение типичной животной клетки.

Внутри клеточной оболочки находится *цитоплазма*, в которой взвешены многочисленные включения. Самое крупное из них — *ядро*, расположенное ближе или дальше от центра; ядро окружено двойной мембраной, пронизанной большим числом пор. При тщательном изучении цитоплазмы живой клетки, предпочтительно путем фазово-контрастной микроскопии, можно ясно различить

ряд палочковидных структур — *митохондрий*. Если подобрать подходящий фиксатор, то митохондрии удастся обнаружить и на фиксированных препаратах, используя специальные методы окрашивания, например метод Альтмана. Легко обнаруживаемые в живой клетке при помощи соответствующих методов митохондрии становятся незаметными после обработки ткани любым из обычно применяемых гистологических фиксаторов, например формалином.



Фиг. 46. Схематическое изображение типичной животной клетки.
1 — ядрышко; 2 — пора; 3 — митохондрия; 4 — рибосомы; 5 — клеточная мембрана; 6 — эндоплазматическая сеть; 7 — лизосома; 8 — пузырьки; 9 — секреторная гранула; 10 — ядро.

Цитоплазма некоторых клеток, например клеток поджелудочной железы, содержит также более или менее сферические *секреторные* гранулы, число которых изменяется с изменением секреторной активности клетки. В цитоплазме можно различить также *вакуоли* и капельки *жира*. Клетки печени содержат гранулы *гликогена*.

На тканевых срезах, фиксированных и окрашенных обычными методами, в цитоплазме часто можно наблюдать включения базофильного материала [78]. Предполагается, что они представляют собой эндоплазматическую сеть и рибосомы (см. ниже), коагулированные фиксатором.

Значительно подробнее строение клетки было изучено при помощи новейшего метода электронной микроскопии [79—84]. Но алектронных микрофотографиях (3 и 4) митохондрии (размером 0,5 мк — 5 мк × 0,3—0,7 мк) имеют овальные очертания. Каждая митохондрия имеет наружную и внутреннюю мембраны

толщиной около 5 м.к. Внутренняя мембрана образует ряд впячиваний — так называемых *крист*, которые и разделяют оргanelлу на связанные между собой отсеки.

Одним из наиболее интересных компонентов цитоплазмы, обнаруженных при помощи электронного микроскопа, является

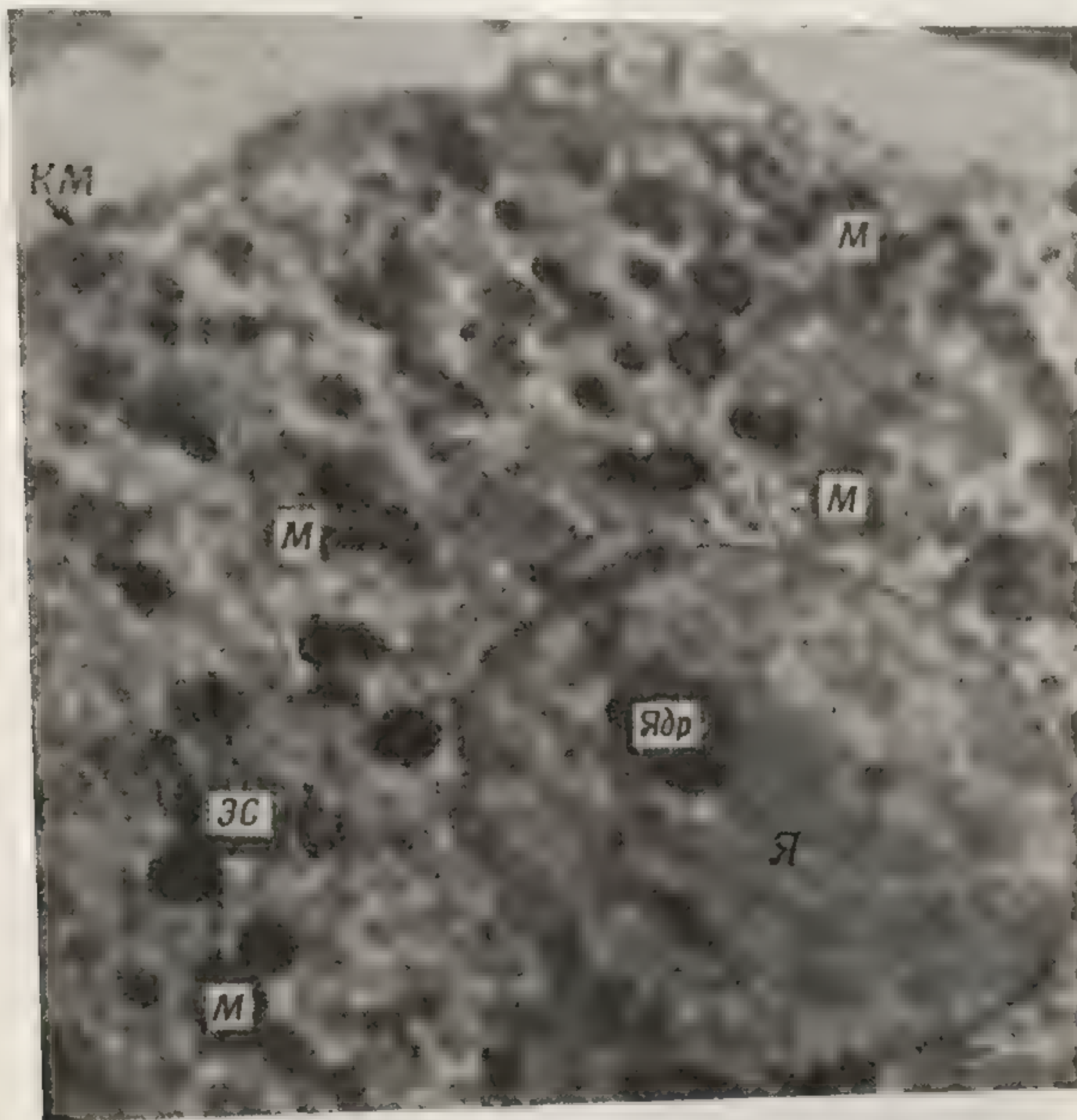


Фото 3. Электронная микрофотография среза части клетки печени. Я — ядро, Ядр — ядрышко, М — митохондрии, ЭС — эндоплазматическая сеть, КМ — клеточная мембрана. $\times 10\,000$ (Уайберн и Даусон).

сложный комплекс трубочек и пузырьков, названный Портером [79] *эндоплазматической сетью* (фото 4). Эта сеть образована мембраной толщиной около 5 м.к, отделяющей содержимое трубочек и пузырьков от основного вещества цитоплазмы. Это придает эндоплазматической сети в целом характер тонко разветвленной системы вакуолей, которая была признана идентичной базофильному или хромофильному компоненту (*эргастоплазмой*) цитоплазмы. Создается впечатление, что трубочки эндоплазматической сети образуют серию канальцев, которые, по мнению ряда видных ученых, тянутся от поверхности клетки к ядру (фиг. 46) [85, 86].

Плотный участок эндоплазматической сети связан с зоной Гольджи, а также с *центросомой* и *центриолями*.

Применение электронного микроскопа дало возможность тщательно изучить строение эндоплазматической сети на очень тонких



Фото 4. Справа: электронная микрофотография митохондрии (из поджелудочной железы голубя) с двойной мембраной и внутренними кристами. Слева: электронная микрофотография эндоплазматической сети в поджелудочной железе кролика. Хорошо видны темные частицы на наружной поверхности, ограничивающей мембраны. $\times 40\ 000$.

срезах клеток печени. Палад и Сикевич [235] показали, что элементы этой сети имеют на срезах округлую, овальную и удлиненную форму и что малый диаметр их варьирует от 40 до 150 мкм.

(они об-
гомоге-
и шер-
(40—10
форму
зующи
ховато
до 5 м
распол
одина
мембра
небол
на эле
Эти ча
ружен
делян
[215].
клетка
Тон
[82, 83]

Мо
ко вел
общих
риаль
ния м

Фиг.
I — кл

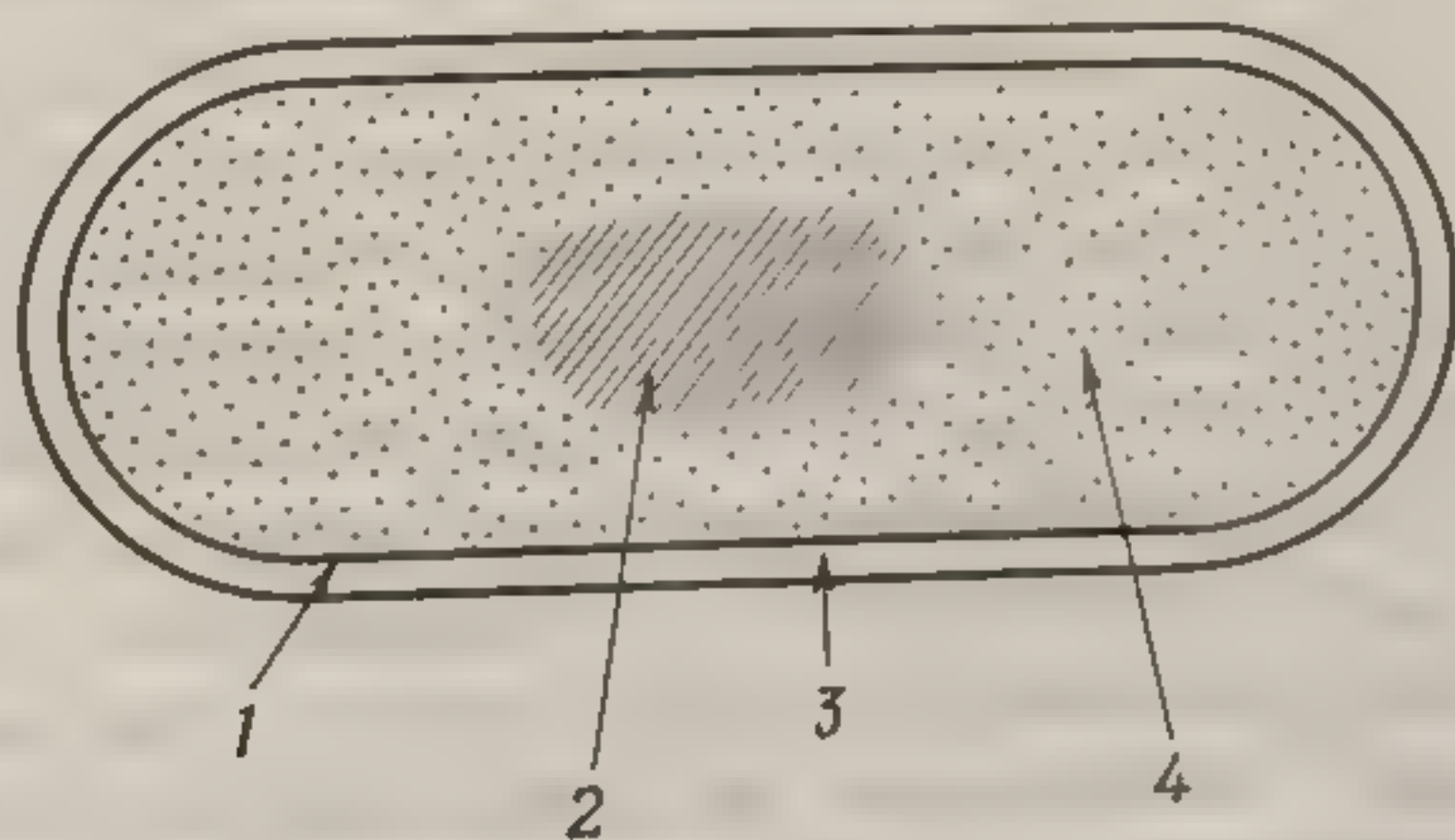
из пре
ную т
очеред
форм
9 Дж

Они образованы очень тонкой мембраной и имеют, по-видимому, гомогенное содержимое. Различают два типа мембран — гладкие и шероховатые. Элементы, образованные гладкими мембранами (40—100 мкм), имеют округлую, овальную или неправильную форму, что соответствует пузырькам и изогнутым трубочкам, образующим густо переплетенную сеть. Элементы, образованные шероховатой мембраной, встречаются чаще; они имеют длину от 50 мкм до 5 мкм и довольно постоянный диаметр около 50 мкм. Часто они располагаются более или менее параллельными рядами на почти одинаковых расстояниях друг от друга (фото 4). Шероховатость мембраны обусловлена наличием на ее наружной поверхности небольших округлых частиц (диаметром 10—20 мкм), имеющих на электронной микрофотографии вид темных точек (фиг. 46). Эти частицы представляют собой рибосомы (стр. 133). Они обнаружены также в свободном виде в цитоплазме, особенно в быстро делящихся клетках, встречаются в ядре и даже в митохондриях [215]. Рибосомы найдены как в бактериальных и растительных клетках, так и в клетках млекопитающих.

Тонкая структура клетки описана в многочисленных обзорах [82, 85—90].

Бактериальная клетка

Морфологические различия между микроорганизмами настолько велики, что их строение может быть описано только в самых общих чертах. Однако на примере обычной палочковидной бактериальной клетки можно рассмотреть основные особенности строения микроорганизмов (фиг. 47). Бактериальная клетка состоит



Фиг. 47. Схематическое изображение строения бактериальной клетки.
1 — клеточная мембрана; 2 — ядерный материал; 3 — клеточная стенка;
4 — цитоплазма.

из *протопласта*, который включает ядро и цитоплазму, окруженную тонкой цитоплазматической мембраной. Мембрана эта в свою очередь тесно связана с твердой *клеточной стенкой* характерной формы. У некоторых бактерий клеточная стенка окружена более

широкой капсулой, состоящей обычно из сложных полисахаридов. Цитоплазма содержит различного типа гранулы. Некоторые из них представляют собой запасные питательные вещества, однако наиболее важные и многочисленные цитоплазматические частицы — это бактериальные рибосомы. В бактериальном ядре, наличие которого в течение многих лет оспаривалось, основным генетическим материалом является, конечно, ДНК.

Полное описание морфологии бактерий можно найти в обычных учебниках по микробиологии [91, 92].

Разделение цитоплазматических компонентов

Состав клеточных компонентов можно изучать *in situ* при помощи уже описанных изящных спектрофотометрических методов. Однако с химической точки зрения наиболее полные данные были получены при изучении отдельных клеточных компонентов, выделенных путем *дифференциального центрифугирования* содержимого клеток, измельченных в подходящей среде.

Первые классические опыты по разделению субклеточных фракций были осуществлены Бенсли [93] и Клодом [94—96]. Разрушенную в солевом растворе ткань печени они разделили на ядерную фракцию, фракцию крупных гранул, включающих митохондрии, фракцию мелких гранул, названных Клодом *микросомами*, и надосадочную фракцию, свободную от оседившего материала.

Фракционирование клеток в солевом растворе осложняется тенденцией гранул образовывать скопления и осаждаться в виде комков, а не в виде отдельных частиц. Это нежелательное явление можно предотвратить, измельчая клетки в 0,88 *M* растворе сахарозы, в котором митохондрии сохраняют палочковидное строение и способность к суправитальному окрашиванию янусом зеленым В. Однако при указанной концентрации сахарозы среда становится настолько вязкой и плотной, что для осаждения субклеточных фракций приходится использовать чрезвычайно высокие скорости центрифугирования. Поэтому в современных исследованиях в качестве среды для измельчения клеток используют 0,25 *M* раствор сахарозы, в котором не происходит агрегации гранул и легко выделяется фракция митохондрий. Последние при этом обладают теми же биохимическими свойствами, что и митохондрии, получаемые в 0,88 *M* растворе сахарозы, хотя они уже не окрашиваются янусом зеленым В и имеют скорее шаровидную, а не удлинненную форму. При разделении путем *дифференциального центрифугирования* субклеточных фракций из гомогената в 0,25 *M* растворе сахарозы, полученного в гомогенизаторе Поттера — Эльвейема, удаление ядер и клеточных обломков, включая

и неразрушенные клетки, достигается центрифугированием при 700 g. После удаления ядерной фракции экстракт центрифугируют в течение 10 мин при 8500 g для осаждения митохондрий и 60 мин при 100 000 g для осаждения микросом. Считается, что полученная в результате надосадочная жидкость происходит из клеточного сока и не содержит осаждаемого материала. Имеются, конечно, различные модификации этой схемы дифференциального центрифугирования; познакомиться с ними можно в многочисленных обзорах [89, 97—104].

Выделяемые подобным способом микросомы (диаметр 16—150 мкм) настолько малы, что они не видны в световом микроскопе, и первоначально эти частицы были лишь «цитохимическим понятием, которое нельзя было отождествить с каким-либо определенным компонентом интактной клетки». Палад и Сикевич [235], изучавшие срезы микросом из ткани печени при помощи электронного микроскопа, обнаружили, что преобладающий структурный элемент этих частиц представлен ограниченными мембранами образованиями. Последние напоминают соответствующие структуры эндоплазматической сети, наблюдаемые на срезах интактной клетки печени. При изучении этих образований в трех измерениях оказалось, что они представляют собой трубочки или пузырьки. Поверхность этих образований может быть и гладкой, однако у большинства из них на поверхности расположены мелкие плотные частицы, сходные с теми, которые видны на электронных микрофотографиях целой клетки (стр. 129). Следовательно, микросомы — это не артефакт, вызванный гомогенизацией ткани, а фрагменты эндоплазматической сети. Они представляют собой цитоплазматические структуры, существование которых в интактной клетке доказано.

Обработка суспензии микросом дезоксихолатом натрия приводит к их разрушению. При этом из мембранного компонента образуются, во-первых, неседиментирующий материал, содержащий большую часть белка и почти все фосфолипиды, пигменты и ферменты, и, во-вторых, фракция частиц, седиментирующих при 100 000 g. Последняя содержит почти 20% белка и едва ли не всю РНК микросом (эта РНК в сущности составляет основную часть РНК цитоплазмы). Эти мельчайшие частицы (которые необходимо строго отличать от собственно микросом), содержащие приблизительно равные количества РНК и белка [105—108, 221], и являются фактически изолированными рибосомами.

Приведенное выше описание выделения цитоплазматических компонентов относится к животным клеткам. Однако следует иметь в виду, что бактериальные клетки также содержат рибонуклеопротеидные гранулы, которые могут быть изолированы при помощи дифференциального центрифугирования [220].

Полученную в результате разрушения клеток смесь внутриклеточных компонентов можно разделить на фракции с различным удельным весом при помощи *центрифугирования в градиенте плотности*. Метод этот состоит в следующем. Полученную смесь центрифугируют в среде с подходящим градиентом плотности до тех пор, пока каждая фракция не образует слой на уровне, соответствующем ее собственной плотности [100, 216—219].

Свойства внутриклеточных фракций: митохондрии

Уже в ранней работе Варбурга [225] в 1913 г. было установлено, что такие цитоплазматические частицы, как митохондрии, обладают дыхательной активностью. Однако их первостепенное значение в жизни клетки выяснилось только в самое последнее время [84].

Благодаря большому относительному объему цитоплазмы (отношение объема ядра к объему плазмы составляет примерно 0,08) клетки паренхимы печени, или гепатоциты, по-видимому, больше любых других клеток подходят для изучения субклеточных фракций. Поэтому сведения о биохимических функциях этих фракций получены в основном в опытах с тканью печени, которая содержит, конечно, и иные типы клеток.

Митохондрии, число которых в каждой клетке печени составляет около 400, содержат приблизительно 17% всего азота клетки и менее 4% всей РНК, сосредоточенной, по крайней мере частично, во внутримитохондриальных рибосомах. В митохондриях обнаружены цитохромоксидаза и другие терминальные оксидазы, участвующие в переносе электронов. Характерным свойством митохондрий является их способность использовать энергию, освобождающуюся при окислении субстрата, для образования богатого энергией фосфорного соединения аденозинтрифосфата (АТФ). Как очаг окислительного фосфорилирования митохондрии иногда называют «силовыми станциями клетки». Митохондрии содержат ДНК.

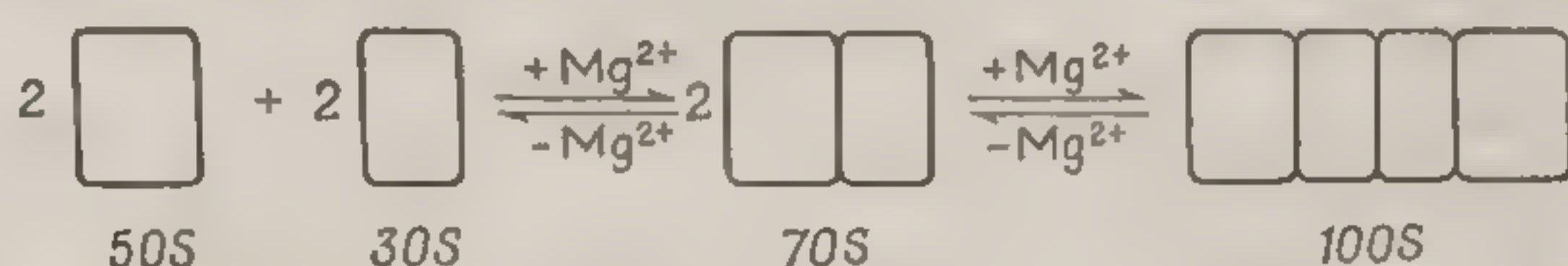
Лизосомы

С митохондриями связаны частицы, названные *лизосомами* [222]. Впервые лизосомы были обнаружены в 1955 г. в клетках печени крыс [223], а в настоящее время известно, что они имеются в большинстве животных клеток. Особенно богаты лизосомами такие клетки, как макрофаги, которым приписывают важнейшие функции переваривания.

Лизосомы (диаметр 200—600 мк) меньше по размерам, чем митохондрии, от которых их можно отделить при помощи центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [104, 222]. Они служатместищем высокоактивных гидролитических ферментов, в том числе рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, фосфатаз, катепсинов, гликозидаз и сульфатаз.

Рибосомы

Термин «рибосома» был введен в 1957 г., чтобы провести различие между карпускулярным материалом рибосом и мембранными компонентами клетки [108, 109]. На электронных микрофотографиях рибосомы имеют вид темных частиц диаметром 20 мк.



Фиг. 48. Влияние магния на образование 70S- и 100S-рибосом.

Они состоят наполовину из белка, наполовину из РНК. Рибосомы найдены в клетках всех типов, причем они могут быть либо в свободном виде, либо прикрепленными к эндоплазматической сети (стр. 129). Они играют важнейшую роль в процессе белкового синтеза (гл. XIII), в течение которого они присоединяются к цепи информационной РНК, образуя комплексы, называемые полисомами [110] (стр. 280). Свойства и биологическая роль рибосом подробно описаны в многочисленных обзорах [103, 108, 109, 111—114].

Особенно интенсивно исследовались рибосомы *E. coli*. Однако следует иметь в виду, что свойства рибосом, по-видимому, мало зависят от источника их получения.

Клетка *E. coli* содержит рибосомы двух типов — 30S-частицы, т. е. частицы с константой седиментации 30 S (мол. вес $1 \cdot 10^6$) и 50S-частицы, т. е. частицы с константой седиментации 50 S (мол. вес $2 \cdot 10^6$). Эти два типа частиц легко могут быть разделены при помощи ультрацентрифугирования. В присутствии определенной концентрации ионов магния эти частицы соединяются попарно, образуя 70S-частицы (мол. вес $3 \cdot 10^6$). Удаление магния приводит к диссоциации 70S-частиц на 30S- и 50S-единицы (фиг. 48). При повышении концентрации магния две 70S-частицы соединяются с образованием 100S-частицы. Частицей, обладающей в клетке функциональной активностью, оказались 70S-частицы. В клетках млекопитающих константа седиментации активных рибосом составляет от 73 до 80 S [116—119].

В рибосомах содержится около 80% всей РНК клетки. Содержание РНК в рибосомах варьирует от 40 до 65%, остальное приходится на долю белка. Рибосомная РНК обладает высоким молекулярным весом (стр. 54); в рибосомных частицах она находится, по-видимому, в виде одной-единственной молекулы. В отличие от этого рибосомные белки гетерогенны.

Клеточный сок

Клеточный сок, в состав которого входят растворимые белки цитоплазмы, содержит около 40% общего азота клетки. Нуклеиновая кислота клеточного сока представлена растворимой РНК, или РНК-переносчиком (*s*-РНК), которая составляет 10–15% всей РНК клетки. Эта РНК не осаждается даже при центрифугировании при 100 000 g, но ее можно осадить вместе со значительной частью белка, если понизить рН до 5 (так называемая фракция «рН5-фермента») (стр. 267). Надосадочная жидкость, которая остается после выпадения этого осадка (*S*₄-фракция), содержит ничтожные количества РНК и немного белка.

Цитоплазматическая ДНК

Обычно считается, что ДНК находится только в ядре. Однако изредка, в исключительных условиях она встречается и в цитоплазме. Например, ДНК или ее производные были обнаружены в виде запасного материала в яйце [120–123] и в авидине белка куриного яйца [124]. ДНК была найдена в цитоплазме некоторых растительных клеток [125, 126], в *Amoeba proteus* [228] и в фибробластах зародыша цыпленка, культивируемых *in vitro* в особых экспериментальных условиях [127, 138]. ДНК содержат такие саморазмножающиеся цитоплазматические частицы, как хлоропласты листьев *Spinacia* [128, 129], *Euglena* [229, 230] и *Acetabularia* [130], а также капса-частицы (фактор «убийцы») *Paramecium* [131] (стр. 316). Более того, ДНК обнаружена в митохондриях [231–234].

Клеточное ядро

Для подробного ознакомления с цитологией клеточного ядра читателю следует обратиться к одному из стандартных учебников [132–134].

Ядро большинства животных клеток представлено округлым телом, расположенным в цитоплазме и окруженным двойной мембраной (фиг. 46). На электронной микрофотографии видно, что в этой мембране имеются поры [135]. В клетках печени на долю

днако
цито-
ужены
белка
торых
ибро-
собых
такие
лоро-
Aceta-
Para-
мито-

ядра
ников
углым
й мем-
о, что
долю

ядра
ников
углым
й мем-
о, что
долю

Следует отметить, что сложное представление о гетерохроматине еще не получило достаточно точного цитологического и генетического подтверждения [136]. Поэтому применение термина «гетерохроматин» следует по возможности ограничивать.

Изолирование клеточных ядер

Следует подчеркнуть, что клеточное ядро — структура не гомогенная. Поэтому химический анализ ядерного вещества в целом, позволяющий составить общее представление о природе и относительном количестве различных компонентов, не дает возможности выяснить распределение этих компонентов между отдельными участками ядра, интересующими цитолога. Вопрос о распределении внутри ядра различных соединений можно разрешить только совместными исследованиями химиков и цитологов в области цитохимии.

Первоначально ядра выделяли из ядродержащих эритроцитов путем гемолиза водой [137], замораживанием и оттаиванием [225], лизолецитином [139], тиротрицином [140] и, что наиболее удобно, сапонином [141].

Из других тканей ядра иногда выделяют следующим образом: хорошо размельченную ткань обрабатывают слабой кислотой, например лимонной, затем подвергают дифференциальному центрифугированию и осадок промывают очень разбавленной кислотой (фото 2). Напомним, что Мишер изолировал ядра из клеток гноя, пользуясь для этого разбавленной уксусной кислотой. Существует еще и метод с использованием лимонной кислоты, развитый и улучшенный Даунсом [142, 143], а также Мирским и Поллистером [144], в чьих работах и можно найти его подробное описание. Изолировав при помощи лимонной кислоты ядра при различных значениях pH, Даунс [142] установил, что ядра, полученные при pH значительно ниже 3,0, несомненно, теряют большую часть содержащегося в них гистона. Поэтому при анализе всей такой ядерной массы данные о содержании нуклеиновых кислот и липидов бывают завышенными. Ядра же, изолированные при pH 6,0—6,2, оказываются лишенными некоторого количества нуклеиновой кислоты и, по-видимому, белков. В большинстве случаев для получения изолированных ядер, свободных от цитоплазматических остатков, применяют повторное промывание ядерной фракции разбавленным раствором хлористого натрия или лимонной кислоты. Не удивительно поэтому, что, как показали Мирский и его сотрудники [224], химическое определение белка всей массы изолированных таким путем ядер дает значительно более низкие величины, чем анализ ядер, выделенных в безводной среде. Впервые выделение ядер в безводной среде было осуществлено Беренсом [145]. Измельченную и лиофилизированную ткань подвергали седimentации в колонках с градиентом плотности органических растворителей. В дальнейшем этот метод был модифицирован и улучшен [144—147]. Преимущест-

ство его заключалось в том, что изолированные ядра сохраняли все кислоторастворимые соединения, а также все ядерные белки.

Были описаны также эффективные методы выделения ядер в растворах сахарозы. Обычно пользуются методом Шнейдера и Питермана [148]; в этом случае применяется 0,25 *M* раствор сахарозы, содержащий 0,0018 *M* CaCl_2 . Филпот и Станнер [149] выделяли ядра из печени крыс в среде, содержащей 0,3 *M* сахарозу, 0,065 *M* глицерофосфат калия, 0,001 *M* MgCl_2 и 40% глицерина. Метаболически активные ядра были получены Уиднеллом и Тата [153] путем гомогенизации ткани в 0,32 *M* растворе сахарозы, содержащем 3 *mM* MgCl_2 , и дальнейшей очистки ядерной фракции в 2,2 *M* растворе сахарозы, содержащем 1 *mM* MgCl_2 .

Качество ядерных препаратов оценивается на основании следующих критериев: 1) морфологические особенности при наблюдении в обычном световом микроскопе, фазово-контрастном микроскопе и электронном микроскопе; 2) наличие таких ферментов, как НАД-пирофосфорилаза (К. Ф., 2.7.7.1), которые встречаются исключительно в ядрах; 3) отсутствие цитоплазматических ферментов, например цитохромоксидазы (К. Ф., 1.9.3.1) или глюкозо-6-фосфатазы (К. Ф., 3.1.3.9).

Этим критериям отвечают препараты ядер, полученные быстрыми и простыми методами, включающими использование детергентов, например тритона X-100 (член октилфеноксиэтанольного ряда) [154] или Твина-80 (монолеат поликсиэтилен-сорбита) [155].

Метаболически активные ядра могут быть получены также путем градиентного центрифугирования в растворах сахарозы, декстрана [156] или фиколля (высокомолекулярный полимер сахарозы) [157].

Методам выделения ядер посвящено несколько обзоров [104, 143, 150, 151]. Даже в самых чистых, по данным обычной микроскопии, препаратах ядер при наблюдении в электронном микроскопе можно обнаружить остатки цитоплазмы (152).

Химический состав клеточных ядер

В состав клеточных ядер входят следующие основные компоненты:

- а) дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК);
- б) основные белки — протамины или гистоны;
- в) более сложные белки, в том числе ферменты;
- г) рибонуклеиновая кислота (рибонуклеиновая кислота клеточного ядра, *r*-РНК);
- д) липиды;
- е) другие соединения фосфора [158];
- ж) минеральные элементы, в том числе К, Са и Mg [159].

Первые химические анализы ядер были произведены Мишером, использовавшим для этой цели ядра клеток гноя и головки сперматозоидов лосося. По мнению Седманов [160], при изучении большинства работ Мишера, опубликованных после его смерти Шмидебергом, создается впечатление, что головка сперматозоида лосося состоит на 96% из нуклеата протаминна, а остальные 4% приходятся частично на долю неорганических соединений. Правда, в ранних работах Мишер указывал, что головки сперматозоидов лосося содержат и другие вещества, помимо нуклеиновой кислоты и протаминна. Тем не менее его данные свидетельствуют о том, что клеточное ядро в основном состоит из нуклеопротаминов или нуклеогистонов. Однако в 1942 г. Майер и Гулик [161] обнаружили в клеточном ядре белки, не относящиеся ни к протаминам, ни к гистонам. Касперсон и его сотрудники на основании фотометрического изучения ядер в ультрафиолете пришли к заключению, что ядро содержит не только ДНК и основные белки типа гистонов, но и более сложные белки типа глобулинов, а также небольшое количество РНК [162].

Следовательно, химический состав клеточного ядра гораздо сложнее, чем это предполагалось вначале. Так, в ядрах содержатся жиры, которые могут составлять до 10% их сухого веса, а также ферменты, например НАД-пирофосфорилаза, относящаяся, несомненно, к более сложным белкам, чем гистоны.

Протамины и гистоны

Уже давно было установлено, что клеточные ядра содержат простые основные белки типа гистонов и протаминов с низким молекулярным весом порядка 2000. Протамины — это простые основные белки, богатые аргинином и не содержащие тирозина и триптофана.

Строение гистонов несколько сложнее: в их состав входит тирозин, но триптофан содержится в небольших количествах или отсутствует. Поэтому указанные основные белки можно различить с помощью реактива Миллона: гистоны дают положительную реакцию, а протамины — отрицательную.

Протамины [163] обнаружены в головках сперматозоидов лосося и сельди; у некоторых рыб они отсутствуют. Так, сперма трески содержит гистон. Гистоны обычно находятся в ядрах соматических клеток, составляя от 3% в некоторых опухолях до 24% в эритроцитах птиц [164].

Встречаются гистоны двух типов — богатые аргинином и богатые лизином [165—172]. В зубной железе телят отношение между первыми и вторыми составляет 9:1. Аминокислотный состав гистонов этой ткани приведен в табл. 12.

Амино

Аспара
Глутам
Глицин
Аланин
Валин
Лейцин
Изолей
Серин
Треонин
Цистин
Метион
Пролин
Фенил
Тирозин
Гистидин
Лизин
Аргинин* Со
ния азоВ
ДНК,
электр
тонам
струк
полож
малог
жител
живан
фосфа
Фу
данны
ДНК
пятст
и рег
вопро

Таблица 12

Аминокислотный состав гистонных фракций из зубной железы теленка

Аминокислота	Содержание азота, % *	
	богатая лизином фракция А	богатая аргинином фракция Б
Аспарагиновая кислота	1,5	3,5
Глутаминовая кислота	2,4	5,9
Глицин	5,0	6,2
Аланин	19,5	7,7
Валин	3,6	4,6
Лейцин	3,1	5,8
Изолейцин	0,7	3,4
Серин	4,8	3,7
Треонин	4,3	4,0
Цистин	0	0,2
Метионин	0	0,7
Пролин	7,0	2,7
Фенилаланин	0,35	1,3
Тирозин	0,34	2,0
Гистидин	0	4,6
Лизин	42,4	16,2
Аргинин	5,1	27,7

* Содержание азота во фракциях выражено в процентах от общего содержания азота.

Нуклеопротамины и нуклеогистоны

В клеточных ядрах головок сперматозоидов большая часть ДНК, заряженной, конечно, отрицательно, структурно связана электростатическими силами с положительно заряженными гистонами и протаминами [173]. На основании результатов рентгеноструктурного анализа нуклеопротаминов было высказано предположение, что протаминная пептидная цепь расположена вдоль малого желобка двойной спирали ДНК (фиг. 28). При этом положительно заряженные концы аргининовых боковых цепей удерживаются электростатическими силами отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК [173, 177, 178].

Функция основных ядерных белков неясна. Имеются, однако, данные в пользу того, что гистоны в желобках двойной спирали ДНК участвуют в процессах регуляции белкового синтеза, препятствуя транскрипции определенных сегментов цепи ДНК, и регулируют синтез белка [174—176]. К обсуждению этого вопроса мы вернемся на стр. 287.

Нуклеопротенды клеточного ядра, нерастворимые в 0,14 М NaCl, растворяются в более концентрированных растворах [144]. Гомогенизированную ткань, например селезенки или печени, прежде всего тщательно промывают в 0,14 М растворе хлористого натрия для удаления цитоплазматического материала. При размешивании полученного таким путем остатка в молярном растворе хлористого натрия ядерный материал растворяется с образованием вязкого раствора нуклеопротенда. Затем этот раствор разбавляют, вливая его в шестикратное по объему количество воды, что приводит к осаждению комплекса в виде нитевидного материала, легко наматывающегося при помешивании на палочку. Выпавший в осадок материал состоит из трех основных компонентов — нуклеиновой кислоты (главным образом ДНК), гистона и негистонного белка. Для разделения этих компонентов осадок встряхивают в смеси 1 М хлористого натрия с хлороформом, содержащим немного октанола (стр. 63). Центрифугирование смеси приводит к отделению водного раствора нуклеиновой кислоты в виде верхнего слоя. Белок, образующий гель на поверхности раздела хлороформ — вода, можно удалить, промыть спиртом и высушить. Из этого смешанного белка гистон можно выделить экстракцией разбавленной кислотой; остающийся после этого негистонный белок содержит триптофан.

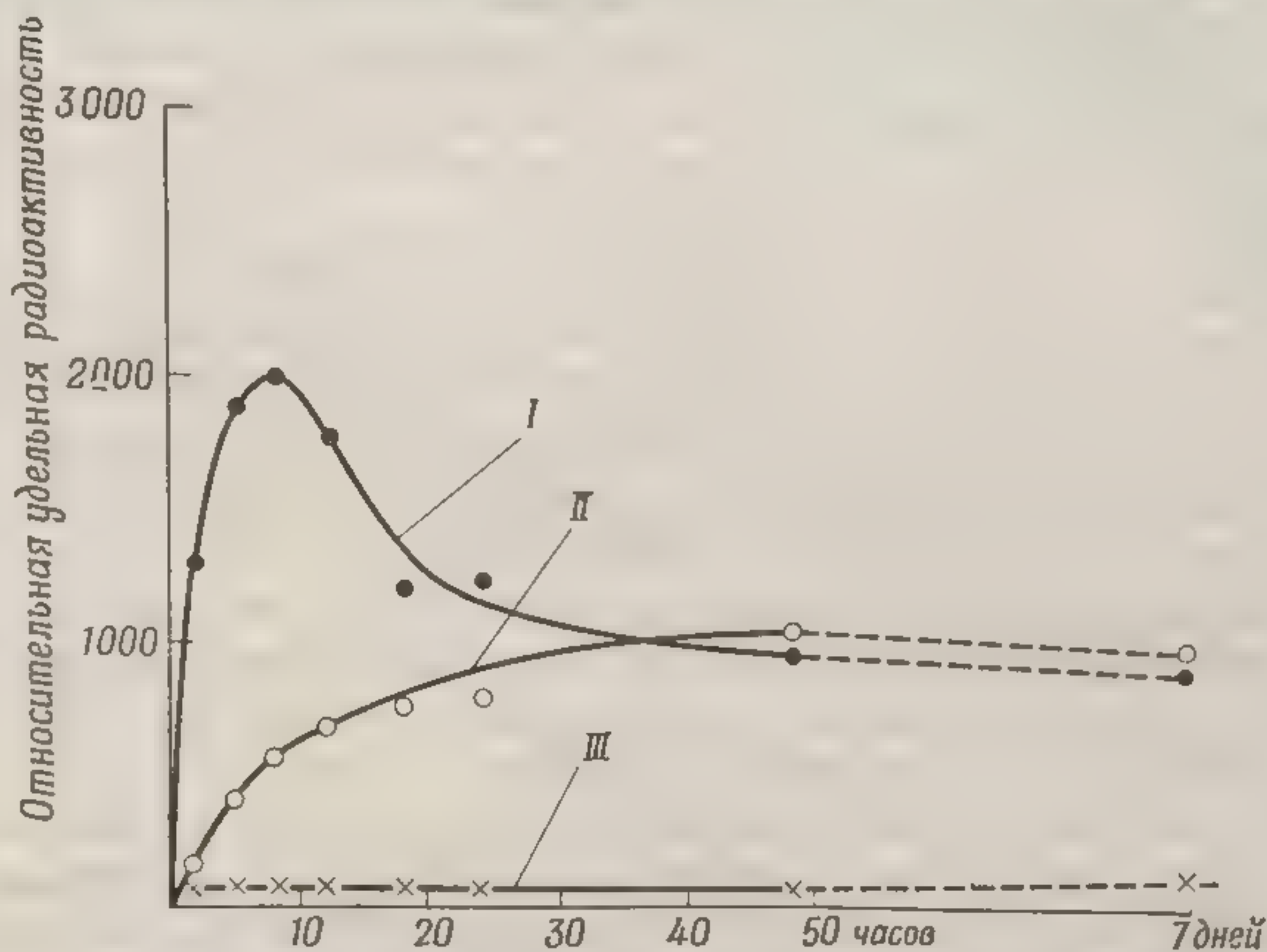
По мнению Поллистера [179], при использовании обычных методов выделения ядер происходит значительная потеря белка, поскольку содержание белка, определяемое количественными спектрофотометрическими методами, значительно выше, чем в изолированных ядрах [146]. Поллистер считает, что ядро клетки печени млекопитающих в состоянии интерфазы содержит 9% ДНК, 1% РНК, 11% гистона, 14% остаточного белка (стр. 143) и 65% других негистонных белков.

Ядерным белкам посвящены многочисленные обзоры [177, 178, 180, 181]. Роль ядра в биосинтезе белка обсуждается в гл. XIII (стр. 287).

РНК клеточного ядра

Судя по результатам ранних определений пентозы, произведенных Браше [182], а затем Дэвидсоном и Уэймаусом [183], в ядрах некоторых тканей по крайней мере 10% нуклеиновых кислот представлено РНК. Результаты гистохимического исследования подтвердили это наблюдение. Оказалось, что хроматин, окрашивающийся красителем Унна — Паппенгейма в синий цвет, после обработки рибонуклеазой окрашивается этой смесью в зеленый. Следовательно, ферментом разрушается пиронинофильный компонент. РНК обнаружена и в ядрышке, и в хромосомах.

Количество РНК в клеточном ядре (*n*-РНК) значительно варьирует в зависимости от типа ядра. В печени крысы *n*-РНК составляет около $\frac{1}{5}$ общего содержания нуклеиновых кислот ядра. В ядрах зубной железы содержится значительно меньше *n*-РНК,



Фиг. 49. Включение P^{32} *in vivo* в ядерную РНК (I), цитоплазматическую РНК (II) и ДНК (III) почек кролика через различные промежутки времени после введения изотопа.

а в ядрах некоторых опухолей сравнительно много [158]. Гистохимически показано, что *n*-РНК локализована в ядрышке и в хромосомах.

Ядерная РНК отличается высокой метаболической активностью [184, 185]. Впервые это было обнаружено Бергстрандом и сотрудниками [186] в опытах с N^{15} -глицином. В дальнейшем многочисленные данные других авторов подтвердили, что включение меченых предшественников в молекулу *n*-РНК происходит значительно быстрее, чем в РНК любой цитоплазматической фракции. На фиг. 49 приведен график, иллюстрирующий включение P^{32} в различные фракции РНК почек. Подобные результаты были получены в опытах с включением в РНК других предшественников, например C^{14} -формиата, C^{14} -аденина, N^{15} -глицина, C^{14} -глицина, C^{14} -оротовой кислоты, как в нормальных тканях, так и в опухолях [184, 187—194]. Высокая метаболическая активность *n*-РНК (в ядрышке) была установлена также радиоавтографически [195].

Клеточное ядро содержит по меньшей мере три типа РНК [226], из которых наибольшее значение имеет, несомненно, информационная РНК. Подробно ее роль будет рассмотрена в гл. XII.

Ядрышко

В покоем ядре большая часть *n*-РНК сосредоточена в ядрышке, что особенно хорошо заметно в тех клетках, где интенсивная базофилия цитоплазмы свидетельствует о высоком содержании РНК. Ядрышко дает обычно отрицательную реакцию Фельгена, за исключением, может быть, периферических участков, прилегающих к хроматину, связанному с ядрышком. Центральная часть ядрышка обладает четко выраженным свойством к основным красителям и способностью поглощать ультрафиолетовые лучи с длиной волны 257 мк. Оба эти свойства исчезают после действия рибонуклеазы [196]. По-видимому, центральная часть ядрышка состоит из рибонуклеопротеида, окруженного дезоксирибонуклеиновой оболочкой [197]. В ядрышках растительных клеток обнаружена ДНК [198].

Ядрышки были изолированы в большом количестве из овоцитов морской звезды [199] и из ядер печени крыс, разрушенных ультразвуком [200, 226]. Установлено, что первые содержат только РНК, вторые — больше ДНК, чем РНК.

Биологическая функция ядрышек еще далеко не выяснена, хотя она и служит предметом интенсивного изучения и темой многочисленных обзоров [201—205, 227]. Существует предположение, что ядрышко принимает участие в образовании и сохранении РНК-рибосом [204, 206].

Хромосомы

Диаметр двойной спирали ДНК составляет около 2 мк; диаметр же самых тонких хромосомных нитей, видимых в обычный световой микроскоп, составляет от 100 до 200 мк. Следовательно, такие нити должны содержать либо большое число тяжей ДНК, организованных в сложную нуклеопротеидную структуру, либо одну длинную спираль ДНК, закрученную в сложный клубок [181]. Даже нити хромосом типа ламповых щеток из овоцитов амфибий имеют диаметр около 20 мк, т. е. они значительно шире, чем двойная спираль ДНК. Каким образом спирали ДНК изгибаются или закручиваются в хромосомных нитях, окончательно еще не установлено, хотя уже имеются ценные сведения об ультраструктуре хромосом, полученные при помощи электронного микроскопа [83, 213, 214].

Для изучения химического состава хромосом Браше [207] пользовался гистохимическими методами, представители школы Касперсона учитывали интенсивность поглощения хромосомами ультрафиолетовых лучей, а Мирский и Рис [208] подвергали химическому анализу изолированные хромосомы. Мирский и Рис

разрушали ядра длительным выдерживанием в смесителе Уоринга или пропусканием через коллоидную мельницу. Освобожденные таким образом нити хроматина, по мнению этих авторов, морфологически идентичны хромосомам [209, 210], однако некоторые исследователи возражают против этого утверждения [211]. При помощи указанной методики были получены «изолированные хромосомы» из эритроцитов рыбы и домашней птицы, а также из зубной железы и печени в количестве, достаточном для химического анализа.

Если полученные таким образом хромосомы лимфоцитов поместить в нейтральный 1 М раствор хлористого натрия, то они диспергируют с образованием очень вязкой взвеси. Центрифугирование последней в течение 1—2 час со скоростью 18 000—19 000 об/мин приводит к появлению плотного осадка и слегка опалесцирующей, очень вязкой надосадочной жидкости. В надосадочной жидкости содержится большое количество нуклеогистона, составляющего 90—92% хромосомной массы [208]. Нуклеиновая кислота в нуклеогистоне представлена почти целиком ДНК. При вливании вязкого раствора нуклеогистона в шестикратное по объему количество воды образуется волокнистый осадок, содержащий 45% ДНК и 55% гистона.

Нерастворимый в 1 М растворе хлористого натрия осадок при рассмотрении в микроскоп имеет вид множества скрученных нитей, сходных с хромосомами, но более мелких. Эти нити, названные Мирским и Рисом [208] «остаточными хромосомами», составляют 8—10% массы исходных хромосом. В продольном направлении они дифференцированы на более широкие участки компактно скрученного гетерохроматина и зоны более свободно скрученного эухроматина. Нуклеиновая кислота остаточных хромосом составляет всего лишь около 4% общего ее количества в хромосомах и представлена главным образом РНК. Содержание РНК в остаточных хромосомах колеблется в пределах 7,5—14%, а ДНК составляет всего 1,5—2,6%.

В то время как исходные хромосомы дают интенсивную реакцию Фельгена, остаточные хромосомы окрашиваются лишь слегка, поскольку большая часть дезоксирибонуклеиновой кислоты перешла в раствор в виде нуклеогистона. Исходные хромосомы окрашиваются смесью пиронина и метилового зеленого в пурпурово-синий цвет, а остаточные хромосомы — в красный, что соответствует относительному содержанию в этих образованиях нуклеиновой кислоты.

Обработка остаточных хромосом горячей трихлоруксусной кислотой приводит к удалению нуклеиновой кислоты. Полученный таким образом «остаточный белок» содержит 13% азота и 1,36% триптофана. Его считают идентичным триптофансодержащему

белку негистонного типа, описанному ранее Мирским и Поллистером [144].

Относительное содержание в хромосомах различных компонентов варьирует в зависимости от источника их получения. Так, в эритроцитах рыбы остаточные хромосомы составляют лишь 5% всех хромосом, а в клетках печени — 40—50%. В хромосомах печени содержится всего 45% нуклеогистона, тогда как хромосомы лимфоцитов на 90% состоят из него. Относительное содержание нуклеиновой кислоты, представленной РНК, составляет 12% в хромосомах печени, 3% в хромосомах зубной железы и 0,15% в хромосомах спермы форели [208].

Содержание остаточного белка в хромосомах составляет 4% у эритроцитов карпа, 8,5% у зубной железы телят, 39% у печени телят, 33% у почек телят и 29% у поджелудочной железы быка [209].

В собственно клеточном соке, полученном из овоцитов амфибий методом микропрепаровки, не обнаружено нуклеиновых кислот в количествах, доступных определению.

Содержание ДНК в ядре и изменения, происходящие в течение митотического процесса, рассматриваются в гл. XIV.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feulgen R., Rossenbeck H., Hoppe Seyler's Ztschr., 135, 203 (1924).
2. Lessler M. A., Internat. Rev. Cytol., 2, 231 (1953).
3. Swift H., The Nucleic Acids, Vol. 2, p. 51 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1955).
4. Kurnick N. B., Internat. Rev. Cytol., 4, 221 (1955).
5. Leuchtenberger C., Science, 120, 1022 (1954).
6. de Tomasi J. A., Stain Technol., 11, 137 (1936).
7. Overend W. G., Stacey M., Nature, 193, 538 (1949).
8. Brachet J., Symp. Exp. Biol., 1, 207 (1947).
9. Lessler M. A., Arch. Biochem. Biophys., 32, 42 (1951).
10. Li C., Stacey M., Nature, 163, 538 (1949).
11. Overend W. G., J. Chem. Soc., p. 2769 (1950).
12. Di Stefano H. S., Nat. Acad. Sci., 34, 75 (1948); Chromosoma, 3, 282 (1948).
13. Walker P. B. M., Richards B. M., The Cell, Vol. 1, p. 91 (J. Brachet and A. E. Mirsky, Eds.), New York, Academic Press (1959).
14. Glick D., The Cell, Vol. 1, p. 139 (J. Brachet and A. E. Mirsky, Eds.), New York, Academic Press (1959).
15. Pollister A. W., Swift H., Alferf M., J. Cell. Comp. Physiol., Suppl., 1, 101 (1951).
16. Pollister A. W., Rev. d'Hematologie, 5, 527 (1950).
17. Leuchtenberger C., General Cytochemical Methods, Vol. 1, p. 219 (J. F. Danielli, Ed.) (1958).
18. Pollister A. W., Ornstein, Anal. Cytol., 1, 3 (1955).
19. Swift H., Internat. Rev. Cytol., 2, 1 (1953).
20. Köhler A., Z. wiss. Mikr., 21, 129 (1904).

21. Barnard J. E., Welch F. V., Practical Photomicrography, 3rd Edition, p. 306. London, Arnold (1936).
22. Lavin G. I., Rev. Sci. Inst., 14, 375 (1943).
23. Stedman E., Stedman E., Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 232 (1947).
24. Rupert J., J. Gen. Physiol., 45, 703 and 725 (1962).
25. Michaelis L., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12, 131 (1947).
26. Brachet J., C. R. Soc. Biol. Paris, 133, 88 (1940).
27. Kurnick N. B., Stain Technol., 27, 233 (1952).
28. Sanders F. K., Quart. J. micr. Sci., 87, 203 (1946).
29. Kurnick N. B., Exp. Cell Res., 1, 151 (1950); J. Gen. Physiol., 33, 243 (1950).
30. Armstrong J. A., Exp. Cell Res., 11, 640 (1956).
31. Brachet J., Arch. Biol., 53, 207 (1941).
32. Davidson J. N., Waymouth C., Proc. Roy. Soc. Edin., 62B, 96 (1944).
33. Davidson J. N., Waymouth C., J. Physiol., 105, 191 (1946).
34. Dempsey E. W., Wislocki G. B., Amer. J. Anat., 76, 277 (1945).
35. Davidson J. N., Leslie I., White J. C., J. Path. Bact., 60, 1 (1948).
36. Stowell R. E., Zorzoli A., Stain Technol., 22, 51 (1947).
37. Kaufmann B. P., McDonald M., Gay H., J. Cell Comp. Physiol., 38, Suppl. 1, 71 (1951).
38. Brachet J., Quart. J. micros. Sci., 94, 1 (1953).
39. Danielli J. F., Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 101 (1947).
40. McDonald M., J. Gen. Physiol., 32, 39 (1948).
41. Catcheside D. G., Holmes B., Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 225 (1947).
42. Davidson J. N., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12, 50 (1947).
43. Korson R., Stain Technol., 26, 265 (1951).
44. Erickson R. O., Sax K. B., Ogur M., Science, 110, 472 (1949).
45. Koenig H., Stahlecker H., Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y., 79, 159 (1952).
46. Di Stefano H. S., Science, 115, 316 (1952).
47. Sulkin M. M., Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y., 78, 32 (1951).
48. Vendrely C., C.R. Acad. Sci. Paris, 228, 606 (1949).
49. Lumb E. S., Quart. Rev. Biol., 25, 278 (1950).
50. Lison L., Histochemie et Cytochemie Animales (2nd ed.), Paris, Gautier-Villars (1953).
51. Pearse A. G. E., Histochemistry, Theoretical and Applied, London, Churchill, 1953. (Пирс Э., Гистохимия, М., ИЛ, 1962.)
52. Davies H. G., Walker P. M. B., Progress in Biophys. and Biophys. Chem., Vol. 3, p. 195 (J. A. Butler and J. T. Randall, Eds.) (1953).
53. Caspersson T., Cell Growth and Cell Function, New York, Norton, 1950.
54. Barer R., Holiday E. R., Hope E. M., Biochim. Biophys. Acta, 6, 127 (1950).
55. Barer R., Lancet, i, 533 (1949).
56. Mirsky A. E., Ris H., J. Gen. Physiol., 34, 451 (1951).
57. Pollister A. W., Rad. Biol., 2, 203 (1955).
58. Pollister A. W., Himes M., Ornstein L., Fed. Proc., 10, 629 (1951).
59. Swift H., Rasch E., Physical Techniques in Biological Research, Vol. 3, p. 553 (G. Oster and A. W. Pollister, Eds.) (1956).

60. Walker P. B. M., Deeley E. M., *Exp. Cell Res.*, 10, 155 (1956).
61. Walker P. B. M., *Exp. Cell Res.*, 8, 567 (1955).
62. Deeley E. M., *J. Sci. Inst.*, 32, 263 (1955).
63. Caspersson T., *Skand. Arch. Physiol.*, 73, Suppl. No. 8 (1936).
64. Caspersson T., *Fed. Proc.*, 20, 858 (1961).
65. Caspersson T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1, 127 (1947).
66. Caspersson T., *Experientia*, 11, 45 (1955).
67. Walker P. B. M., *General Cytochemical Methods*, Vol. 1, p. 163 (J. F. Danielli, Ed.) (1958).
68. Scott J. F., *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. 1, p. 131 (G. Oster and A. W. Pollister, Eds.) (1955).
69. Walker P. B. M., *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. 3, p. 401 (G. Oster and A. W. Pollister, Eds.) (1956).
70. Leuchtenberger C., Leuchtenberger R., Vendrely C., Vendrely R., *Exp. Cell Res.*, 3, 240 (1952).
71. Frazer S. C., Davidson J. N., *Exp. Cell Res.*, 4, 316 (1953).
72. Davies H. G., *Exp. Cell Res.*, 3, 453 (1952).
73. Walker P. M. B., Yates H. B., *Proc. Roy. Soc. B.*, 140, 274 (1953).
74. Gersh I., Bodian D., *J. Cell Comp. Physiol.*, 21, 253 (1943).
75. Blount E. R., Fields M., *J. Biol. Chem.*, 178, 335 (1949).
76. Fraser R. D. B., Chayen J., *Exp. Cell Res.*, 3, 492 (1952).
77. Caspersson T., Schultz J., *Nature*, 142, 294 (1939); *ibid.*, 143, 602 (1939).
78. Stenram U., *Acta histochem.*, 5, 156 (1958).
79. Porter K. R., *Harvey Lectures*, Series 51, p. 175 (1955—1956).
80. Palade G. E., *J. Histochem. Cytochem.*, 1, 188 (1953).
81. Sjöstrand F. S., Hanzon V., *Exp. Cell Res.*, 7, 393 (1954).
82. Finean J. B., *Chemical Ultrastructure in Living Tissues*, Springfield, Thomas, 1960.
83. Ris H., *Canad. J. Genetics and Cytol.*, 3, 95 (1961).
84. Lehninger A. L., *The Mitochondrion*, New York, Benjamin, 1964. (Ленинджер А., Митохондрия, М., «Мир», 1966.)
85. Siekevitz P., *Ciba Symposium on the Regulation of Cell Metabolism*, p. 17, London, Churchill (1959).
86. Hagenau F., *Internat. Rev. Cytol.*, 7, 425 (1958).
87. Harman J. W., *J. Clin. Path.*, 11, 495 (1958).
88. Robertson J. D., *Biochem. Soc. Symp. No. 16, The Structure and Function of Subcellular Components*, p. 3, Cambridge University Press (1959).
89. Brachet J., Mirsky A. E. (Eds.), *The Cell*, New York, Academic Press, 1959.
90. Mercer E. H., *Cells and Cell Structure*, London, Hutchinson, 1961.
91. Stainier R. Y., Doudoroff M., Adelberg E. A., *General Microbiology* (2nd Edition), London, Macmillan, 1963.
92. Oginsky E. L., Umbreit W. W., *Introduction to Bacterial Physiology* (2nd Edition), San Francisco, Freeman, 1959.
93. Bensley R. R., *Anat. Rec.*, 69, 341 (1937).
94. Claude A., *Science*, 97, 451 (1943); *Biol. Symp.*, 10, 111 (1943).
95. Claude A., *Science*, 90, 213 (1939); *ibid.*, 91, 77 (1940); *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 9, 263 (1941).
96. Claude A., *J. Exp. Med.*, 84, 51 (1946).
97. Hogeboom G., Schneider W. C., *The Nucleic Acids*, Vol. 2, p. 199 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press, 1955.
98. Schneider W. C., Hogeboom G., *Ann. Rev. Biochem.*, 25, 201 (1956).

99. Anderson N. G., Physical Training Techniques in Biological Research, Vol. 3, p. 299 (G. Oster and A. W. Pollister, Eds.) (1956).
100. Allfrey V., The Cell, Vol. 1, p. 193 (J. Brachet and A. E. Mirsky, Eds.), New York, Academic Press (1959).
101. Hogeboom G., Kuff E. I., Schneider W. C., Internat. Rev. Cytol., Vol. 6, p. 425 (G. H. Bourne and J. F. Danielli, Eds.), New York, Academic Press (1957).
102. Palade G. E., Microsomal Particles and Protein Synthesis, p. 36 (R. B. Roberts, Ed.) (1958).
103. Hayashi T. (Ed.), Subcellular Particles, London, The Ronald Press (1959).
104. Methods of Separation of Subcellular Structural Components, Biochemical Society Symposium No. 23 (1963).
105. Peterman M. L., Mizen N. A., Hamilton M. G., Cancer Res., 13, 372 (1953).
106. Littlefield J. W., Keller E. B., Elizabeth B., Gross J., Zamecnik P. C., J. Biol. Chem., 217, 111 (1955).
107. Peterman M. L., Hamilton M. G., Balis M. E., Smarth K., Pecova P., Microsomal Particles and Protein Synthesis (R. B. Roberts, Ed.), p. 70 (1958).
108. Roberts R. B. (Ed.), Microsomal Particles and Protein Synthesis, London, Pergamon Press (1958).
109. Roberts R. B., Britten R. J., McCarthy B. J., Molecular Genetics, Part I, p. 292 (J. H. Taylor, Ed.), New York, Academic Press (1963). (Молекулярная генетика, М., «Мир», 1964, стр. 78.)
110. Rich A., Sci. Amer., 209, 44 (1963).
111. Watson J. D., Science, 140, 73 (1963).
112. Elson D., Discovery, 25, 24 (1964).
113. Webster G., Whitman S. L., Vth Internat. Congress Biochem., Moscow, Symposium No. 11 (1961). (V Международный биохимический конгресс, Москва, 1961, М., АН СССР, 1962.)
114. Ts'o P. O. P., Ann. Rev. Plant Physiol., 13, 45 (1962).
115. Tissières A., Watson J. D., Schlessinger D., Hollingsworth B. R., J. Mol. Biol., 1, 221 (1959).
116. Noll H., Staehelin T., Wettstein F. O., Nature, 198, 632 (1963).
117. Gierer A., J. Mol. Biol., 6, 148 (1963).
118. Zimmerman E. F., Biochem. Biophys. Res. Comm., 11, 301 (1963).
119. Warner J. R., Rich A., Hall C. E., Science, 138, 1399 (1962).
120. Hoff-Jørgensen E., Zeuthen E., Nature, 169, 245 (1952).
121. Hoff-Jørgensen E., Recent Developments in Cell Physiology, p. 79 (J. Kitching, Ed.) (1954).
122. Marshak A., Marshak C., Exp. Cell Res., 8, 126 (1955).
123. Agrell I., Persson H., Nature, 178, 1398 (1956).
124. Fraenkel-Conrat H., Snell N. S., Ducay E. D., Arch. Biochem. Biophys., 39, 80 (1952).
125. Chayen J., Excerpta Medica, 8, 445 (1954).
126. Martin E. M., Morton R. K., Biochem. J., 64, 221 (1956).
127. Chèvremont M., Biochem. J., 85, 25P (1962).
128. Pollard C. J., Arch. Biochem. Biophys., 105, 114 (1964).
129. Chun E. H. L., Vaughan M. H., Jr., Rich A., J. Mol. Biol., 7, 130 (1963).
130. Gibor A., Izawa M., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 1164 (1963).
131. Smith-Sonneborn J., Green L., Marmur J., Nature, 197, 385 (1963).

132. Darlington C. D., Mather K., The Elements of Genetics, London, Allen and Unwin, 1949.
133. Waddington C. H., Introduction to Modern Genetics (3rd Edition), London, Allen and Unwin, 1956.
134. Wagner R. P., Mitchell H. K., Genetics and Metabolism (2nd Edition) New York, Wiley, 1964.
135. Watson M. L., Biochim. Biophys. Acta, 15, 475 (1954); J. Biophys. Biochim. Cytol., 1, 257 (1955).
136. Schultz J., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12, 179 (1947).
137. Ackermann D., Z. Physiol. Chem., 43, 299 (1904).
138. Chevremont M., Bassleer R., Baeckeland E., Arch. Biol., 72, 501 (1961).
139. Laskowski M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 49, 534 (1942).
140. Villela G. G., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 66, 398 (1947).
141. Dounce A. L., Lan T. H., Science, 97, 584 (1943).
142. Dounce A. L., J. Biol. Chem., 147, 685 (1943); *ibid.*, 151, 221 and 235 (1943).
143. Dounce A. L., The Nucleic Acids, Vol. 2, p. 93 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1955).
144. Mirsky A. E., Pollister A. W., J. Gen. Physiol., 30, 117 (1946).
145. Behrens M., Aberhalden's Handbuch d. biologische Arbeitsmethoden, Sect. 5, Part. 10, 1363 (1938).
146. Dounce A. L., Tishkoff G. H., Barnett S. R., Freer R. M., J. Gen. Physiol., 33, 629 (1950).
147. Kay E. R. M., Smellie R. M. S., Humphrey G. F., Davidson J. N., Biochem. J., 62, 160 (1956).
148. Schneider R. M., Peterman R., Cancer Res., 10, 751 (1950).
149. Philpot J. St. L., Stanier J. E., Biochem. J., 63, 214 (1956).
150. Allfrey V., The Cell, Vol. 1, p. 193 (A. E. Mirsky, J. Brachet, Eds.), New York, Academic Press, 1959.
151. Siebert G., Smellie R. M. S., Internat. Rev. Cytol., 6, 383 (1957).
152. Davison P. F., Mercer E. H., Exp. Cell Res., 11, 237 (1956).
153. Widnell C. C., Tata J. R., Biochem. J., 92, 313 (1964).
154. Hymer W. C., Kuff E. L., J. Histochem. Cytochem., 12, 359 (1964).
155. Fisher H. W., Harris H., Proc. Roy. Soc., B, 156, 521 (1962).
156. Fisher W. D., Cline G. B., Biochim. Biophys. Acta, 68, 640 (1963).
157. Allfrey V. G., Littau V. C., Mirsky A. E., J. Cell Biol., 21, 213 (1964).
158. McIndoe W. M., Davidson J. N., Brit. J. Cancer, 6, 200 (1952).
159. Gulick A., Advances in Enzymology, 4, 1 (1944).
160. Stedman E., Stedman E., Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 232 (1947).
161. Mayer D. T., Gulick A., J. Biol. Chem., 146, 433 (1942).
162. Caspersson T., Die Naturwissenschaften, 29, 33 (1941).
163. Felix K., Frocher H., Krekels A., Progress in Biophys. and Biophys. Chem., 6, 2 (1956).
164. Stedman E., Stedman E., Nature, 152, 556 (1943).
165. Luck J. M., Rasmussen P. S., Satake K., Tsvetkov A. N., J. Biol. Chem., 233, 1407 (1958).
166. Cruft H. J., Mauritzen C. M., Stedman E., Nature, 174, 580 (1954).
167. Daly M. M., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol., 38, 405 (1955).
168. Butler J. A. V., Davidson P. F., James D. W. F., Shooter K. V., Biochim. Biophys. Acta, 13, 224 (1954).
169. Davison P. F., Butler J. A. V., Biochim. Biophys. Acta, 15, 439 (1954).

170. Davison P. F., James D. W. F., Shooter K. V., Butler J. A. V., *Biochim. Biophys. Acta*, 15, 415 (1954).
171. Moore S., Onzième Conseil de Chimie, Institut de Chimie Solvay, Bruxelles Stoops, 1959.
172. Johns E. W., *Biochem. J.*, 92, 55 (1964).
173. Wilkins M. H. F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 21, 75 (1956).
174. Bonner J., T'so P. O. P., The Nucleohistones, San Francisco, Holden Hay (1964).
175. Busch H., Steele W. J., Hnilica L. S., Taylor C. W., Mavioglu H., *J. Cell Comp. Physiol.*, 62, 95 (1963).
176. Bloch D. P., *J. Cell Comp. Physiol.*, 62, 87 (1963).
177. Shooter K. V., *Progress in Biophys. and Biophys. Chem.*, 8, 309 (1958).
178. Schachman H. K., *J. Cell Comp. Physiol.*, 49, 71 (1957).
179. Pollister A. W., Swift H., Alfert M., *J. Cell Comp. Physiol.*, 38, Suppl. 1, 101 (1951).
180. Busch H., Davis J. R., *Cancer Res.*, 18, 1291 (1958).
181. Haggis G. H., Michie D., Muir A. R., Roberts K. B., Walker P. B. M., *Introduction to Molecular Biology*, London, Longmans, 1964. (Харгис Г. и др., Введение в молекулярную биологию, М., «Мир», 1967.)
182. Brachet J., *Enzymologia*, 10, 87 (1941).
183. Davidson J. N., Waymouth C., *Biochem. J.*, 38, 39 (1944).
184. Smellie R. M. S., McIndoe W. M., Logan R., Davidson J. N., Dawson I. A., *Biochem. J.*, 54, 280 (1953).
185. Crosbie G. W., Smellie R. M. S., Davidson J. N., *Biochem. J.*, 54, 287 (1953).
186. Bergstrand A., Eliasson N. A., Hammarsten E., Norberg B., Reichard P., v. Ubsch H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 13, 22 (1948).
187. Jeener R., Szafarz D., *Arch. Biochem.*, 26, 54 (1950).
188. Barnum C. P., Huseby R. A., *Arch. Biochem.*, 29, 7 (1950).
189. Barnum C. P., Huseby R. A., Vermund H., *Cancer Res.*, 13, 880 (1953).
190. Anderson E. P., Aqvist S. E. G., *J. Biol. Chem.*, 202, 513 (1953).
191. Tyner E. P., Heidelberger C., LePage G. A., *Cancer Res.*, 13, 186 (1953).
192. Marshak A., Vogel H. J., *J. Cell Comp. Physiol.*, 36, 97 (1950).
193. McIndoe W. M., Davidson J. N., *Brit. J. Cancer*, 6, 200 (1952).
194. Hurlbert R. B., Potter V. R., *J. Biol. Chem.*, 195, 257 (1952).
195. Ficq A., *Arch. Biol.*, 66, 509 (1955).
196. Davidson J. N., Waymouth C., *J. Physiol.*, 105, 191 (1946).
197. Lagerstedt S., *Acta Anatomica*, Suppl. IX (1949).
198. McLeish J., *Nature*, 204, 36 (1964).
199. Vincent W. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 38, 139 (1952).
200. Monty K. J., Litt M., Kay E. R. M., Dounce A. L., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 127 (1956).
201. Vincent W. S., *Internat. Rev. Cytol.*, 4, 269 (1955).
202. Stich H., *Experimentia*, 12, 7 (1956).
203. Sirlin J. L., *Endeavour*, 20, 146 (1961).
204. Sirlin J. L., *Progress in Biophys. and Biophys. Chem.*, 12, 27 (1962).
205. Sirlin J. L., Jacob J., *Nature*, 195, 114 (1962).
206. Chipchase M. I. H., Birnstiel M. L., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 1101 (1963).

207. Brachet J., Arch. Biol., 53, 207 (1941).
208. Mirsky A. E., Ris H., J. Gen. Physiol., 31, 1 and 7 (1947).
209. Mirsky A. E., Ris H., Nature, 163, 666 (1949).
210. Denués A. R. T., Exp. Cell Res., 4, 333 (1953).
211. Lamb W. G. P., Nature, 164, 109 (1949); Exp. Cell Res., 1, 571 (1950).
212. Brown G. L., Callan H. G., Leaf G., Nature, 165, 600 (1950).
213. Ambrose E. J., Prog. Biophys. and Biophys. Chem., 6, 26 (1956).
214. Stern H., Phys. Rev., 42, 271 (1962).
215. Rendi R., Exp. Cell Res., 17, 585 (1959).
216. Albright J. F., Anderson N. G., Exp. Cell Res., 15, 271 (1958).
217. Bomstein R. A., Sterberl E. A., Biochim. Biophys. Acta, 31, 548 (1959).
218. Thomson J. F., Kilpfel F. J., Exp. Cell Res., 14, 612 (1958).
219. Meselson M., Stahl F. W., Vinograd J., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 43, 581 (1957).
220. Gillchriest W. C., Boch R. M., Microsomal Particles and Protein Synthesis (R. B. Roberts, Ed.), p. 1 (1958).
221. Peterman M., Physical and Chemical Properties of Ribonucleoproteins, Amsterdam, Elsevier, 1964.
222. De Duve C., Sci. Amer., 208, 64 (1963).
223. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmanns F., Biochem. J., 60, 604 (1955).
224. Allfrey V., Stern H., Mirsky A. E., Saetren H., J. Gen. Physiol., 35, 529 (1952).
225. Warburg O., Z. Physiol. Chem., 70, 413 (1910).
226. Maggio R., Siekevitz P., Palade G. E., J. Cell Biol., 18, 293 (1963).
227. Busch H., Byroet P., Smetana K., Cancer Res., 23, 313 (1963).
228. Wolstenholm D. R., Plaut W., J. Cell Biol., 22, 505 (1964).
229. Edelman M., Cowan C. A., Epstein H. T., Schiff J. A., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 1214 (1964).
230. Brawerman G., Eisenstadt J. W., Biochem. Biophys. Acta, 91, 477 (1964).
231. Luck D. J. L., Reich E., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 931 (1964).
232. Kalf G. F., Biochemistry, 3, 1762 (1964).
233. Nass S., Nass M. M. K., J. Nat. Cancer Inst., 33, 777 (1964).
234. Schatz G., Haslbrunner E., Tuppy H., Monatshefte für Chem., 95, 1135 (1964).
235. Palade G. E., Siekevitz P., J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 171 and 671 (1956).
236. Pollister A. W., Ris H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12, 147 (1947).
237. Shimanouchi T., Tsuboi M., Kyogoku Y., Advances in Chemical Physics, Vol. 7, p. 435 (Ed. J. Duchesne), New York, Interscience, 1964.

Сложн
и животн
Проблема
которых
полипукл
защитной
скую спе
Данн
численны
Как
в некотор

ГЛАВА IX

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ВИРУСОВ

Введение

Сложность строения и химического состава высших растений и животных сильно затрудняет изучение их нуклеиновых кислот. Проблема несколько облегчается при работе с вирусами, строение которых значительно проще — вирус состоит в сущности из полинуклеотидного тяжа РНК или ДНК, находящегося внутри защитной белковой оболочки, которая определяет иммунологическую специфичность вируса.

Данные о химическом составе вирусов можно найти в многочисленных обзорах [1—6, 20, 43, 48, 67, 75, 151].

Как видно из табл. 13, содержание нуклеиновой кислоты в некоторых из обычных вирусов варьирует в широких пределах —

Таблица 13

Содержание нуклеиновых кислот в вирусах
(данные разных авторов)

Вирус	РНК, %	ДНК, %
Гриппа	1	—
Лошадиного энцефаломиеелита	4	—
Табачной мозаики	5	—
Мозаики люцерны	15	—
Кустистой карликовости томата	17	—
Крапчатости бобов обыкновенных	18	—
Некроза табака	18	—
Полномиеелита	30	—
Бактериофага MS2	31	—
Желтой мозаики турнепса	35	—
Кольцевой пятнистости табака	40	—
Осповакцины	—	6
Папилломы Шопа	—	9
Герпеса простого	—	10
Полиэдрома непарного шелкопряда	—	13
Бактериофага T2	—	44

от 1 до 50%. В то время как растительные вирусы содержат исключительно РНК, в состав вирусов животных и бактерий (бактериофагов) входит либо РНК, либо ДНК.

Вирусы растений

Наши знания о нуклеиновых кислотах вирусов первоначально были основаны преимущественно на изучении препаратов, полученных из растительных вирусов, так как последние доступны в больших количествах и в некоторых случаях могут быть очищены до кристаллического состояния (например, вирусы табачной мозаики, некроза табака, огуречной мозаики, желтой мозаики турнепса, кольцевой пятнистости табака, кустистой карликовости томата). Большинство работ было сделано с вирусом табачной мозаики. В 1935 г. Стенли [7] впервые выделил этот вирус в кристаллическом виде, а годом позже, в 1936 г., Боуден и Пирри [8] обнаружили в этом вирусе нуклеиновую кислоту. Дальнейшие исследования показали, что вирусы растений являются, по-видимому, простыми нуклеопротеидами, содержание РНК в которых колеблется в пределах от 5 до 40%.

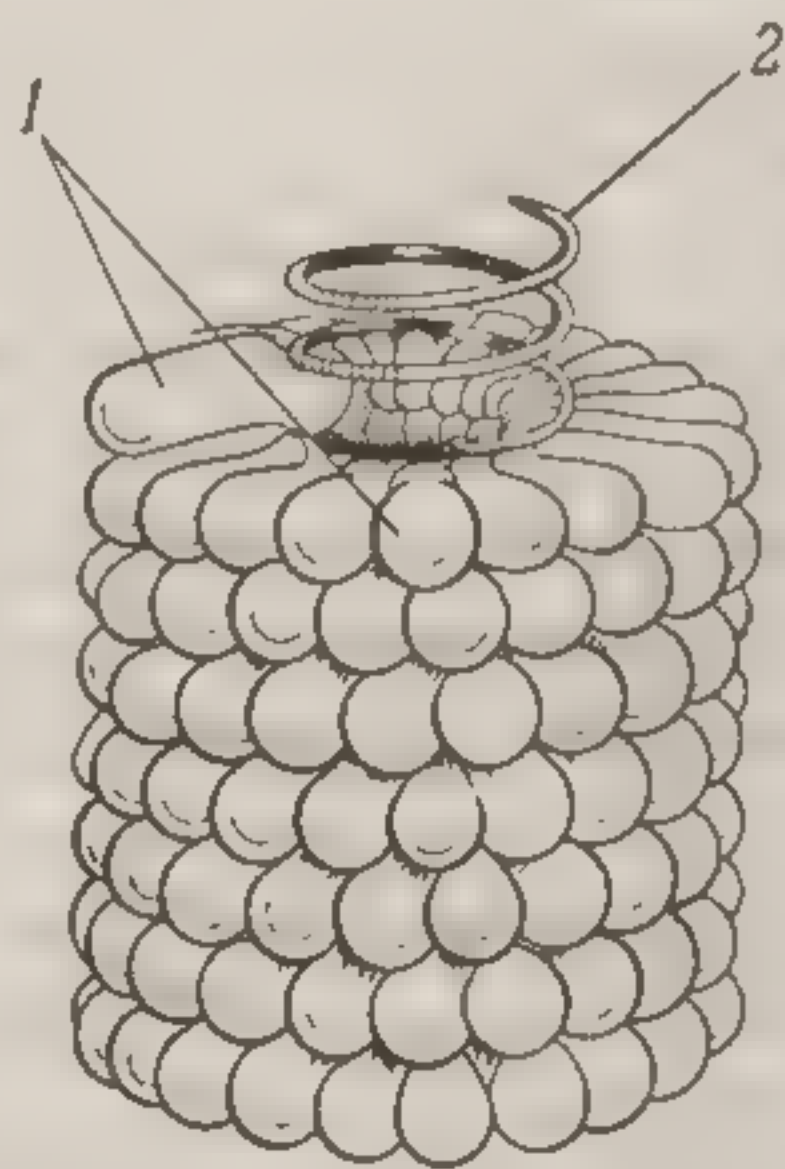
По строению различают растительные вирусы двух основных типов — сферические и палочковидные. Лучшим примером последнего типа может служить вирус, вызывающий мозаичную болезнь растений табака.

Вирус табачной мозаики

Вирус табачной мозаики (ВТМ) легко может быть получен в больших количествах. В связи с этим он служил объектом очень большого числа исследований, результаты которых являются основой наших современных представлений о растительных вирусах (см. обзоры [4, 5, 9—13, 37, 43, 52, 78]). Вирус табачной мозаики можно получить в виде почти полностью гомогенных (по химическим, физическим и генетическим свойствам) частиц с молекулярным весом $40 \cdot 10^6$. Вирусные частицы представляют собой высокоорганизованные структуры, имеющие форму палочки размером $15 \cdot 300$ мкм. Они содержат 5% РНК и 95% белка. Белок состоит примерно из 2100 субъединиц с молекулярным весом 18 000, расположенных в виде спирали. Нуклеиновая кислота представлена одной-единственной длинной молекулой с молекулярным весом $2 \cdot 10^6$ [44], спирально скрученной внутри белка, который образует защитную оболочку, или футляр. Ценные сведения о тонком строении вирусных частиц получены в результате применения рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии. Детали строения частиц ВТМ были выяснены в значитель-

ной мере благодаря работе Франклина [1, 20]. Упрощенная схема строения ВТМ приведена на фиг. 50. Если концы вируса частично растворить обработкой додецилсульфатом натрия, то на электронных микрофотографиях можно видеть, что из сохранившегося остатка частицы высовывается РНК-сердцевина диаметром около 4 мкм [74]. Эту сердцевину можно удалить рибонуклеазой.

Одним из основных достижений в изучении биологии нуклеиновых кислот было установление того факта, что свободная РНК,



Фиг. 50. Сегмент частицы вируса табачной мозаики.

Видны белковые субъединицы, расположенные по спирали. РНК находится в спиральном желобке, образуемом белковыми субъединицами. Часть белковых субъединиц на рисунке не показана, чтобы можно было видеть два витка спирали РНК [79].
1 — белковые субъединицы; 2 — РНК.

изолированная из ВТМ фенольным методом или при помощи додецилсульфата натрия, не теряет инфекционности и в отсутствие белка ВТМ [24, 71, 72]. Ее инфекционность нарушается под действием рибонуклеазы, но сохраняется при обработке ВТМ антисывороткой. В то же время ВТМ инактивируется антисывороткой, но не рибонуклеазой. Инфекционность такой изолированной РНК составляет всего 0,3% инфекционности эквивалентного количества РНК в неповрежденном вирусе.

Френкель-Конрату [13, 25, 50] удалось реконструировать полную частицу вируса табачной мозаики, смешивая РНК и белок этого вируса. Активность реконструированных частиц составляла 30—60% активности исходного вируса.

Последовательность расположения 164 аминокислот в белке ВТМ установлена полностью [80]. Значительные успехи достигнуты и в изучении последовательности нуклеотидов в РНК этого вируса [81, 82]. Согласно имеющимся данным, различные штаммы ВТМ отличаются как по содержанию аминокислот в их белковом компоненте [54], так и по последовательности нуклеотидов в их РНК [26, 45]. Белок, по-видимому, является всего лишь защитной оболочкой для инфекционной вирусной РНК.

Френкель-Конрат [27, 37] получил гибридный вирус, соединив РНК из подорожничкового штамма ВТМ с белком обычного штамма.

Различие между белками этих двух штаммов состоит в том, что у подорожничкового штамма белок содержит метионин и гистидин, отсутствующие в белке нормального штамма. Вирусы эти различаются по своим иммунологическим свойствам. Оказалось, что гибридный вирус вызывает заболевание, характерное для подорожничкового штамма, но по иммунологическим свойствам напоминает обычный штамм. Потомство же гибридного вируса содержит метионин и гистидин, подобно белку подорожничкового штамма, из которого первоначально была получена нуклеиновая кислота вируса, и в отличие от белка гибрида, использованного в качестве инокулума. Эти результаты доказывают, что генетические особенности вируса определяются его РНК, но не его белком.

В процессе размножения вируса в организме хозяина происходит отделение вирусного белка от РНК [28, 29]. При заражении растительной клетки свободной РНК синтез вируса в ней начинается раньше, чем после заражения интактным вирусом. Сначала размножается РНК вируса, претерпевающая превращение в двухцепочечную репликативную форму (стр. 250) [144, 145]. Затем под контролем РНК начинается образование вирусного белка и наконец белок и РНК соединяются, формируя полный вирус [51, 53].

При обработке РНК вируса табачной мозаики азотистой кислотой аминооснования превращаются в соответствующие гидроксилсодержащие основания, а нуклеотидная цепь при этом не разрывается. Если такую измененную РНК использовать для заражения растений табака, то можно получить серию искусственных мутантов ВТМ, заметно различающихся по составу или по последовательности аминокислот в белке [30—32, 43, 83—85]. Эти четкие различия представляют большой интерес для изучения генетического кода (стр. 275).

Сферические вирусы растений

Вирус желтой мозаики турнепса, который был получен в кристаллическом виде, отличается высоким содержанием РНК, составляющим 35%. Вирусная частица представляет собой полый шар, внутри которого находится нуклеиновая кислота [33]. При помощи фенольной экстракции из этого вируса была получена инфекционная РНК с молекулярным весом $2,3 \cdot 10^6$ [86].

Вирусы насекомых [36, 55]

Среди полиэдральных вирусов насекомых можно выделить вирусы ядерных полиэдрозов, содержащие ДНК, и вирусы цитоплазматических полиэдрозов, содержащие РНК. Типичным при-

мером первых могут служить полиэдральные тельца непарного шелкопряда (*Prothetria dispar*) и тутового шелкопряда (*Bombyx mori*).

РНК-содержащие вирусы животных

Из мелких вирусов животных диаметром менее 50 мкм, лишенных ферментативной активности, в кристаллическом виде были получены вирус полиомиелита и вирус Коксеки. Эти вирусы содержат РНК и не содержат ДНК. По морфологии они напоминают сферические растительные вирусы. РНК содержат также близкие к ним по размеру и богатые липидами вирусы энцефалита.

Содержание РНК в вирусах гриппа и птичьей чумы составляет соответственно 1 и 3%. Эти вирусы представляют собой шаровидные частицы диаметром от 70 до 80 мкм, которые могут обладать ферментативной активностью. Большой интерес вызывает РНК вируса гриппа, о которой известно, что относительное соотношение оснований в ее молекуле у разных штаммов может быть различным [38—42].

Вирус птичьего миэлобластоза (диаметр 12 мкм), один из немногих вирусов, связанных с возникновением злокачественности, содержит 2,2% РНК [47].

Установлено, что лишенная белка РНК, экстрагированная из некоторых животных вирусов, действует как инфекционное начало и обладает поэтому свойствами генетического детерминанта. Подобного рода инфекционная РНК была получена из вирусов лошадиного энцефаломиелита [14, 15, 101], энцефалита Менго [16], полиомиелита [16—18], западнонильского энцефалита [17], энцефаломиокардита (ЭМК) мышей [23] и ящура [22, 87].

Биосинтез вирусной РНК будет рассмотрен в гл. XII (стр. 248).

ДНК-содержащие вирусы животных

ДНК обнаружена во многих вирусах животных, в том числе в вирусах осповакцины, кроличьей папилломы Шопа, пситтакоза, контагиозного моллюска, обычных бородавок, герпеса простого и полиомы. Инфекционная ДНК была экстрагирована из вируса полиомы [103], кроличьей папилломы [102] и обезьяньего вируса [104].

ДНК вируса осповакцины имеет двухцепочечное строение; ее молекулярный вес составляет $80 \cdot 10^6$ [88]. Из вируса папилломы Шопа были получены две формы ДНК с одинаковым молекулярным весом, но с различными константами седиментации (21 S и 28 S). 28S-компонент представляет собой, по-видимому, двухцепочечное кольцо, которое раскрывается с образованием 21S-компонента [89]. ДНК, экстрагированная из вируса герпеса простого, харак-

теризуется двухцепочечным строением, молекулярным весом $50 \cdot 10^6$ — $60 \cdot 10^6$, а также высоким содержанием (68%) гуанина и цитозина [90—92].

К числу наиболее интересных ДНК-содержащих вирусов относятся онкогенные вирусы. Среди них различают три основные группы: 1) вирус полиомы и обезьяний вирус 40; 2) вирусы папиллом кролика, человека, быка и собаки; 3) аденовирусы типов 7, 12, 18 [146]. ДНК всех этих вирусов по своему нуклеотидному составу сходны с ДНК клеток, в которых они могут вызвать неопластическую трансформацию. Они могут содержать даже целые сегменты, гомологичные сегментам клеточной ДНК.

Одним из наиболее основательно изученных ДНК-содержащих вирусов является вирус полиомы [93—95]. Ее ДНК, содержащую в сумме 48% гуанина и цитозина [99], можно разделить на три компонента, различающихся по константе седиментации. Компоненты I и II соответствуют двум конфигурациям одной и той же молекулы. Тогда как компонент I, быстрее оседающий, имеет замкнутое или кольцевое строение (стр. 72), цепь компонента II открыта [96—98, 146, 147]. Оба компонента характеризуются одинаковыми величинами плотности и молекулярного веса ($3,5 \cdot 10^6$). Компонент I превращается в компонент II в результате одного-единственного разрыва цепи, вызванного ДНК-азой. Как кольцевая, так и открытая формы видны на электронных микрофотографиях [98]. Природа компонента III еще не выяснена.

Инфекционность присуща как открытой, так и замкнутой формам [148], которые способны к взаимным превращениям. Однако искусственно открытая форма ДНК, полученная под действием ДНК-азы, в отличие от нативной открытой формы не обладает инфекционностью. Это объясняется, по-видимому, тем, что фермент разрывает молекулы ДНК в любом случайном месте, тогда как концы нативных открытых молекул соответствуют строго определенному участку кольца, который играет роль связок. Возможно, что во время репродукции кольцевых молекул связка открыта, а затем она закрывается с образованием кольца [146].

Вирус полиомы был впервые изолирован из тканей мыши с лейкемией — этот вирус способен размножаться в культуре ткани. При заражении этим вирусом новорожденных мышей или хомяков наблюдается появление злокачественных опухолей в самых различных тканях. При введении больших количеств вируса в культуры клеток хомяка или мыши наблюдается «трансформация» характера клеток [95, 100]. При пересеве трансформированные или опухолевые клетки сохраняют свои новые свойства. Эти клетки отличаются морфологически от нормальных клеток и напоминают выращиваемые в культуре клетки опухолевых тка-

ней — как по внешнему виду, так и по высокой интенсивности аэробного гликолиза.

Неопластическая трансформация может быть вызвана вирусной ДНК [103, 148]. Возможно, что она обусловливается введением нового гена, который включается в ДНК хозяина и реплицируется вместе с ней. Вирус может действовать либо как мутаген, вызывающий изменение последовательности оснований ДНК, а тем самым и изменение белков в инфицированной клетке, либо он может удалять или инактивировать репрессор клеток хозяина и таким образом вызывать проявление неопластических свойств, уже заложенных в этих клетках. Какова бы ни была природа неопластической трансформации, вызванной ДНК вируса полиомы, явление это, несомненно, имеет важнейшее биологическое значение.

Бактериофаги

Совершенно ясно, что технически довольно трудно наблюдать, каким образом вирусы растений и животных внедряются в клетки своих хозяев и размножаются там; трудно также изучать роль нуклеиновой кислоты вируса в этих процессах. Удобным объектом для такого рода исследований служат бактериофаги — вирусы, поражающие бактериальные клетки. Они легко поддаются биохимическому изучению, главным образом благодаря быстрому размножению их в клетках хозяина. Бактериофаги широко использовались при исследованиях в области молекулярной генетики и репликации нуклеиновых кислот. Частицы бактериофага могут содержать либо ДНК, либо РНК.

ДНК-содержащие бактериофаги

Наиболее интенсивному изучению подвергались фаги (колифаги) серии Т, поражающие *E. coli* [46, 49, 56—62, 77, 108—110, 151]. ДНК четных фагов кишечной палочки серии Т [Т2, Т4 и Т6] отличается тем (табл. 14), что вместо цитозина она содержит 5-оксиметилцитозин (5-ОМЦ) [63]. Разные штаммы резко различаются по содержанию глюкозы, связанной гликозидной связью с оксиметильной группой 5-оксиметилцитозина (табл. 15) [64—66, 111].

Одним из наиболее изученных колифагов является фаг Т2. Его частицы напоминают по форме головастиков с несколько удлиненной гексагональной головкой и отростком длиной около 100 мкм; на конце отростка имеются нити, создающие некоторое утолщение (фиг. 51). Проксимальный белок отростка, расположенный между этими нитями и головкой, обладает сократительными

Таблица 14

Молярные соотношения нуклеотидов в ДНК некоторых штаммов колифага

Штамм	Аденин	Гуанин	Тимин	Цитозин	Оксиметилцитозин	Литература
T2r ⁺	32,5	18,2	32,6	—	16,7	[41]
T2r	32,4	18,3	32,4	—	17,0	[41]
T6r	32,5	18,3	32,5	—	16,7	[41]
T5	30,3	19,5	30,8	19,5	—	[41]
T3	23,7	26,2	23,5	27,7	—	[6]

Таблица 15

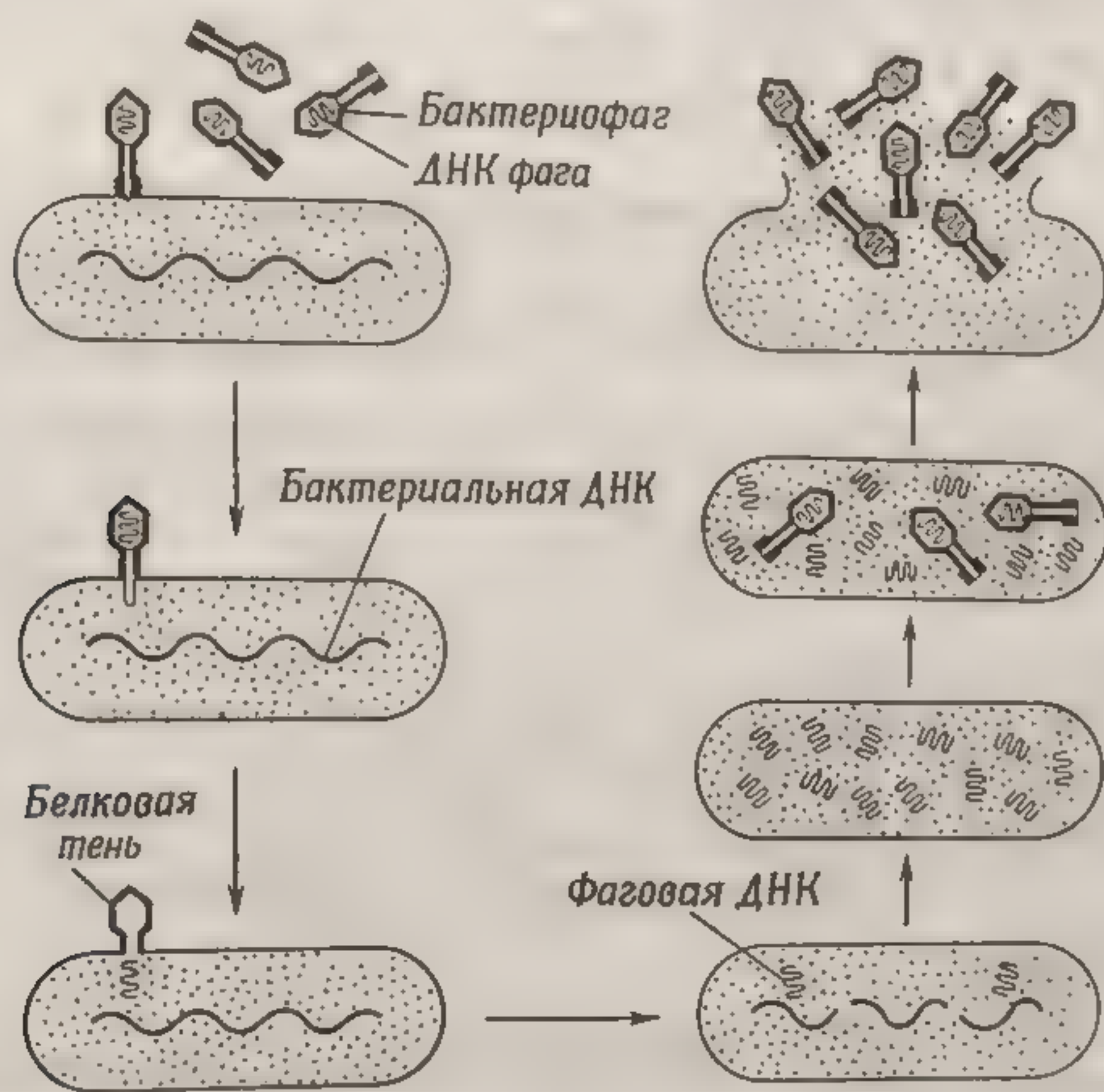
Глюкозилирование остатков оксиметилцитозина в ДНК четных фагов кишечной палочки серии T [111]

	Доля гликозилированных остатков, %		
	T2	T4	T6
Неглюкозилированные остатки	25	0	25
α -Глюкозил	70	70	3
β -Глюкозил	0	30	0
β -Глюкозил- α -глюкозил (диглюкозил)	5	0	72

свойствами и содержит связанные АТФ и дАТФ [49] (фиг. 51). Тщательно очищенные препараты фага гомогенны при ультрацентрифугировании и электрофорезе; молекулярный вес отдельной частицы составляет приблизительно 200 млн. [56, 61]. Фаговые частицы отличаются высоким содержанием ДНК (44%), сосредоточенной в гексагональной головке, которая окружена защитной белковой оболочкой; РНК они не содержат. Метаболической активности у фаговых частиц обнаружить не удалось.

Последовательные этапы фаговой инфекции, изображенные на фиг. 51, сводятся к следующему [49]. В результате обратимой ионной реакции между специфическим рецептором клеточной стенки и нитями отростка фаговые частицы прикрепляются отростком к клетке хозяина. Немедленно после этого образуется более постоянная связь, природа которой еще не установлена. Нити кончика отростка, связанные друг с другом, по-видимому, тиол-

эфирными связями, теперь уже не повреждаются цинком белка клеточной стенки. При этом высвобождается фермент отростка и одновременно происходит сокращение белка фагового отростка, облегчая проникновение через клеточную стенку. Фермент отростка разрушает участок клеточной стенки, с которым он соприкасается, и стержень отростка проникает через внутреннюю клеточную мембрану, освобождая путь для впрыскивания в бактериальную клетку фаговой ДНК. Белковая тень фаговой частицы



Фиг. 51. Цикл размножения фага в зараженных клетках *E. coli*.

остается прикрепленной к клеточной стенке бактерии, откуда ее можно удалить механическим путем. Далее следует вегетативная фаза, в течение которой образуется новый вирусный материал, формирующий группы вирусных частиц. Последние в конечном итоге выходят из клетки при ее лизисе. Весь процесс занимает всего 15—60 мин.

Немедленно после внедрения ДНК в бактериальную клетку геном хозяина перестает существовать как функциональная единица и ДНК фага начинает осуществлять свои собственные фенотипические и генотипические функции. ДНК хозяина уже не может контролировать синтез белков хозяина и служить матрицей для репликации ДНК [112].

Первым этапом в синтезе фаговой ДНК является образование на ДНК фага цепи информационной РНК (стр. 240), которая

в рибосомах хозяина направляет синтез нового набора ферментных белков, специфичных для биосинтеза фаговой ДНК (стр. 215).

Частицы фагов T2 и T4 содержат одну-единственную стабильную молекулу ДНК, представляющую всю нуклеиновую кислоту частицы. Предполагается, что все фаговые частицы действительно содержат по одной молекуле нуклеиновой кислоты. Молекулярный вес ДНК фага T2 составляет приблизительно $11 \cdot 10^7$ (стр. 74) [113]. Молекула фаговой ДНК, по-видимому, по всей длине представляет sdвоенную неразветвленную нить. Электронная микрофотография молекулы ДНК фага T2 показана на фото 1.

Бактериофаг ϕ X174

Одним из наиболее интересных бактериальных вирусов является открытый во Франции в 1935 г. бактериофаг ϕ X174, поражающий *E. coli*. Это мелкий вирус как бы сферической формы [114] с молекулярным весом $6,2 \cdot 10^6$; содержание ДНК в нем составляет 25% по весу. ДНК этого бактериофага, как показал впервые Синсхеймер в 1958 г., является одноцепочечной [69, 115, 116], причем ее цепь, возможно, замкнута в кольцо [117, 118] (стр. 72). ДНК инфекционна только по отношению к сферопластам, но не к нормальным бактериальным клеткам [119]. При репликации этой нуклеиновой кислоты, которая будет рассмотрена ниже (стр. 215), в живой клетке образуется двухцепочечная «репликативная форма».

Другие ДНК-содержащие бактериофаги

Хотя основное внимание биохимиков привлекали T-четные фаги и фаг ϕ X174, другие ДНК-содержащие фаги также представляют известный интерес. К ним относятся фаг α , поражающий *Bacillus tiberius* (*B. megaterium*) [120—122], фаг SP8, поражающий *B. subtilis* [120, 123], фаги A, B, C и D, поражающие *B. cereus* [120], и фаги λ , ϕ R и S13, поражающие *E. coli* [124—127]. Во всех этих фагах была обнаружена двухцепочечная ДНК; исключение составляют лишь фаги ϕ R и S13, которые, подобно фагу ϕ X174, содержат одноцепочечную ДНК.

Фаг SP8 имеет ту особенность, что в его ДНК тимин замещен оксиметилурацилом [120]. ДНК этого фага, как и фага α , интересна в том отношении, что при денатурации она распадается на тяжелую цепь (H), богатую пиримидинами, и легкую цепь (L) с высоким содержанием пуринов (стр. 79). Эти нити можно разделить путем центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия или же при помощи колонок из метилированного альбумина. В то время как *in vitro* обе цепи могут служить мат-

рицами для РНК-полимеразы, только тяжелая цепь способна к образованию гибридов с РНК, синтезированной *in vivo* в организме пораженного вирусом хозяина [123] (стр. 237).

ДНК фага λ , подобно ДНК фага ϕ X174 и фага T1, инфекционна для сферопластов (протопластов) *E. coli* [105—107, 126]. Длина молекулы ДНК фага λ составляет 17,2 мк, что соответствует молекулярному весу $33 \cdot 10^6$. Молекулы ДНК мутанта фага λ с двойной делецией короче на 23%. При температуре 60° концы молекул обоих типов смыкаются с образованием кольцевых форм [124].

РНК-содержащие бактериофаги

Некоторые бактериофаги содержат только РНК. К ним относятся фаги f2 [128, 130], MS2 [129, 131], r17 [132—134], поражающие *E. coli*, и фаг 7S, который поражает *Pseudomonas aeruginosa* [135].

У фага MS2 молекулярный вес частиц составляет $3,6 \cdot 10^6$; содержание РНК — 31%; РНК находится в нем в виде компактной структуры с большим количеством водородных связей; эта РНК инфекционна для бактериальных протопластов. РНК-содержащие фаги представляют значительный интерес для изучения репликации РНК в связи с образованием двухцепочечных молекул РНК (стр. 59) [136—139, 144]. Возможно, что при внедрении РНК-содержащего вируса в клетку РНК играет роль матрицы (стр. 271) для синтеза РНК-зависимой РНК-полимеразы (стр. 246) и белка вирусной оболочки. Образовавшаяся в результате полимеразы синтезирует затем комплементарную цепь РНК, приводя к образованию двухцепочечной репликативной РНК. На этой синтезированной полимеразой комплементарной цепи двухцепочечной формы полимеразы образует новые цепи вирусной РНК. К этому процессу мы еще вернемся в гл. XII (стр. 249).

Интерферон

Интерферон — это противовирусное вещество, образование которого во многих типах животных клеток стимулируется различными вирусами [140, 141]. Он представляет собой белок с молекулярным весом 30 000. Процесс образования интерферона в клетке включает синтез белка и ДНК-зависимый синтез РНК, но не синтез ДНК [150]. Этот процесс во многих отношениях напоминает индуцированный синтез ферментов. Интерферон можно рассматривать как регулирующее вещество, в образовании которого участвует явление дерепрессии (стр. 284). Механизм его действия далеко не выяснен; предполагается, что интерферон предотвращает репликацию вирусной РНК [142, 143].

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. The Nature of Viruses, Ciba Foundation Symposium, London, Churchill (1956).
2. Burnet F. M., Stanley W. M. (Eds.), The Viruses: Biochemical, Biological and Biophysical Properties (6 vols.), New York, Academic Press (1958).
3. Mellors R. C., Fed. Proc., 17, 714 (1958).
4. Markham R., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 18, 141 (1953); 2nd Symp. Soc. Gen. Microbiol., p. 85 (1953); Prog. Biophysics and Biophys. Chem. (J. A. V. Butler and J. T. Randall, Eds.), 3, 61 (1953); Adv. Virus Res., 1, 315 (1953).
5. Schramm G., Ann. Rev. Biochem., 27, 101 (1958).
6. Putman F. W., Ann. Rev. Biochem., 25, 147 (1956).
7. Stanley W. M., Science, 81, 644 (1935).
8. Bawden F. C., Pirie N. W., Nature, 138, 1051 (1937); Proc. Roy. Soc., B, 123, 274 (1938).
9. Schramm G., Les Nucléoproteins, Onzeime Conseil de Chimie, Institut de Chimie, Solvay, pp. 1—11, Bruxelles, R. Stoops, 1959.
10. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 1717 (1959).
11. Fraenkel-Conrat H., The Harvey Lectures, 1958—1959, Series 53, p. 56, New York, Academic Press (1959).
12. Stanley W. M. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 45, 285 (1959).
13. The Biochemistry of Viruses. Symposium No. VII, Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna, 1958.
14. Wecker E., Schäfer W., Zeit. Naturforschung, 12b, 415 (1957).
15. Wecker E., Virology, 7, 241 (1959).
16. Colter J. S., Bird H. H., Brown R. A., Nature, 179, 859 (1957).
17. Colter J. S., Bird H. H., Moyer A. W., Brown R. A., Virology, 4, 522 (1957).
18. Alexander H. E., Koch G., Mountain I. M., van Damme O., J. Exp. Med., 108, 493 (1958).
19. Wildman S. G., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 45(3), 300 (1959).
20. Knight C. A., Chemistry of Viruses, Protoplasmatologia, Vol. 5, No. 2 (1963).
21. Cheng P. Y., Nature, 181, 1800 (1958).
22. Brown F., Sellers F. R., Stewart D. L., Nature, 182, 535 (1958).
23. Huppert J., Sanders F. K., Nature, 182, 515 (1958).
24. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Williams R. C., Biochim. Biophys. Acta, 25, 87 (1957).
25. Fraenkel-Conrat H., Williams R. C., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 41, 690 (1955).
26. Reddi K. K., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 45, 293 (1959).
27. Fraenkel-Conrat H., J. Amer. Chem. Soc., 78, 882 (1956).
28. Siegel A., Ginoza W., Wildman S. G., Virology, 3, 554 (1957).
29. Schramm G., Engler R., Nature, 181, 916 (1958).
30. Schuster H., Schramm G., Zeit. Naturforschung, 13b, 697 (1958).
31. Gierer A., Mundry K. W., Nature, 182, 1457 (1958).
32. Mundry K. W., Gierer A., Zeit. Vererbungsforschung, 89, 614 (1958).
33. Markham R., Smith K. M., Parasitology, 39, 330 (1949).

34. Crick F. H. C., Watson J. D., *Nature*, 177, 473 (1956).
35. Caspar D. L. D., *Nature*, 177, 475 (1956).
36. Smith K. M., *Advances in Virus Research*, 3, 199 (1955).
37. Fraenkel-Conrat H., *Sci. Amer.*, 195, 42 (1956).
38. Ada G. L., Perry B. T., *Nature*, 175, 209 and 854 (1955).
39. Hoyle L., *Symposium No. VII, 4th Internat. Cong. Biochem., Vienna* (1958).
40. Ada G. L., Gottschalk A., *Biochem. J.*, 62, 686 (1956).
41. Miller H. K., *Virology*, 2, 312 (1956).
42. Frommham L. H., Knight C. A., *Virology*, 2, 430 (1956).
43. Markham R., in *Progress in Nucleic Acid Research* (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), Vol. 2, p. 61, New York, Academic Press (1963).
44. Gierer A., *Nature*, 179, 1298 (1957).
45. Reddi K. K., *Biochim. Biophys. Acta*, 32, 386 (1959).
46. Volkin E., *Symposium No. VII, 4th Internat. Cong. Biochem., Vienna* (1958).
47. Beard J. W., Bonar R. A., Beaudreau G. S., Becker C., Beard D., *Symposium No. VII, 4th Internat. Cong. Biochem., Vienna* (1958).
48. Allison A. C., Burke D. C., *J. Gen. Microbiol.*, 27, 181 (1962).
49. Kozloff L. M., *Symposium No. VII, 4th Internat. Cong. Biochem., Vienna* (1948).
50. Fraenkel-Conrat H., Singer B., *Biochim. Biophys. Acta*, 33, 359 (1958).
51. Schramm G., *Symposium No. VII, 4th Internat. Cong. Biochem., Vienna* (1958).
52. Commoner B., *Symposium No. VII, 4th Internat. Cong. Biochem., Vienna* (1958).
53. Рыжков Б. Л., *Symposium No. VII, 4th Internat. Cong. Biochem., Vienna* (1958).
54. Knight C. A., *Symposium No. VII, 4th Internat. Cong. Biochem., Vienna* (1958).
55. Bergold G. H., *Symposium No. VII, 4th Internat. Cong. Biochem., Vienna* (1958).
56. Evans E. A., *Fed. Proc.*, 15, 827 (1956).
57. Hershey A. D., *The Harvey Lectures*, 51, 229 (1955—1956).
58. Burton K., *Biochem. Soc. Symp.*, No. 14, p. 60 (1957).
59. Hershey A. D., *Special Publications of the N.Y. Acad. Sciences*, 5, 251 (1957).
60. Kozloff L. M., Lute M., *J. Biol. Chem.*, 234, 539 (1959).
61. Lwoff A., *Sci. Amer.*, 34, 194 (1955).
62. Evans E. A., Jr., *Essays in Biochemistry* (S. Graff, Ed.), p. 94, New York, Wiley (1956).
63. Wyatt G. R., Cohen S. S., *Biochem. J.*, 55, 774 (1950).
64. Volkin E., *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 5892 (1954).
65. Sinsheimer R. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 42, 502 (1956).
66. Jesaitis M. A., *Nature*, 178, 637 (1956).
67. Horne R. W., *Sci. Amer.*, 208, 48 (1963).
68. Cohen S. S., Arbogast R., *J. Exp. Med.*, 91, 607 (1950).
69. Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.*, 1, 37 and 43 (1959).
70. Thomas C. A., *J. Gen. Physiol.*, 42, 503 (1959).
71. Gierer A., Schramm G., *Zeit. Naturforschung*, 11b, 138 (1956).
72. Schuster V. H., Schramm G., Zillig W., *Zeit. Naturforschung*, 11b, 339 (1956).
73. Levinthal C., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 42, 394 (1956).
74. Hart R. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 41, 261 (1955).

75. Cohen S. S., Ann. Rev. Biochem., 32, 83 (1963).
76. Adams M. H., Bacteriophages, New York, Interscience, 1959.
(Адамс М., Бактериофаги, М., ИЛ, 1961.)
77. Stent G. S., Nature, 182, 1769 (1958).
78. Gierer A., Progress in Biophys. and Biophys. Chem., Vol. 10, p. 299
(J. A. V. Butler, Ed.), London, Pergamon Press (1958).
79. Klug A., Caspar D. L. D., Advances in Virus Research, 7, 225
(1960).
80. Tsugita A., Gish D. T., Young J., Fraenkel-Conrat H., Knight C. A., Stanley W. M., Proc. Nat. Acad. Sci.,
46, 1463 (1960).
81. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Biochemistry, 1, 120
(1962).
82. Whitfield P. R., J. Biol. Chem., 237, 2865 (1962).
83. Tsugita A., Fraenkel-Conrat H., Proc. Nat. Acad. Sci.,
46, 636 (1960).
84. Tsugita A., J. Mol. Biol., 5, 284 (1962).
85. Tsugita A., Fraenkel-Conrat H., J. Mol. Biol., 4, 73
(1962).
86. Haselkorn R., J. Mol. Biol., 4, 357 (1962).
87. Brown F., Newman J. F. E., Stewart Doreen L., Nature,
197, 590 (1963).
88. Joklik W. K., J. Mol. Biol., 5, 265 (1962).
89. Crawford L. V., J. Mol. Biol., 8, 489 (1964).
90. Russell W. C., Crawford L. V., Virology, 22, 288 (1964).
91. Russell W. C., Gold E., Keir H. M., Omura H., Watson
D. H., Wildy P., Virology, 22, 103 (1964).
92. Russell W. C., Crawford L. V., Virology, 21, 353 (1963).
93. Stewart Sarah E., Sci. Amer., Nov., p. 3 (1960).
94. Stoker M. G. P., Brit. Med. J., May 18, p. 1310 (1963).
95. Stoker M. G. P., Viruses, Nucleic Acids and Cancer, p. 487, Baltimore,
Williams and Wilkins (1963).
96. Crawford L. V., Virology, 22, 149 (1964).
97. Dulbecco R., Vogt M., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 236 (1963).
98. Weil R., Vinograd J., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 730 (1963).
99. Crawford L. V., Virology, 19, 279 (1963).
100. Sanders F. K., Burford B. O., Nature, 201, 786 (1964).
101. Wecker E., Virology, 7, 241 (1959).
102. Ito Y., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 47, 1897 (1961).
103. Di Mayorca G. A., Eddy B. E., Stewart S. E., Hunter
W. S., Friend C., Bendich A., Proc. Nat. Acad. Sci.,
46, 1425 (1959).
104. Gerber P., Virology, 16, 96 (1962).
105. Guthrie G. D., Sinsheimer M. L., J. Mol. Biol., 2, 297 (1960).
106. Evans E. A., Mackal R. P., Coleman L., Fed. Proc., 21,
48 (1962).
107. Mayer F., Mackal R. P., Tao M., Evans E. A., J. Biol.
Chem., 236, 1141 (1961).
108. Thomas C. A., Jr., Molecular Genetics, Part I, p. 113 (J. H. Taylor,
Ed.), New York, Academic Press (1963). (Молекулярная генетика,
М., «Мир», 1964, стр. 126.)
109. Luria S. E., Sci. Amer., April, p. 3 (1955).
110. Jacob F., Wollman E. L., Sci. Amer., 204(6), 93 (1961).
111. Lehman I. R., Pratt E. A., J. Biol. Chem., 235, 3254 (1960).
112. Kornberg A., Enzymatic Synthesis of DNA, New York, Wiley
(1961).

113. Cairns J., J. Mol. Biol., 3, 756 (1961).
114. Maclean E. C., Hall C. E., J. Mol. Biol., 4, 173 (1962).
115. Sinsheimer R. L., Fed. Proc., 29, 661 (1961).
116. Sinsheimer R. L., Sci. Amer., 207(1), 109 (1962).
117. Fiers W., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 5, 424 (1962).
118. Hayashi M., Hayashi M. N., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 351 (1964).
119. Sekiguchi M., Taketo A., Takagi Y., Biochim. Biophys. Acta, 45, 199 (1960).
120. Marmur J., Cordes S., Informational Macromolecules, p. 79 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 74.)
121. Cordes S., Epstein H. T., Marmur J., Nature, 191, 1097 (1961).
122. Aurisicchio S., Dore E., Frontali C., Gaeta F., Toschi G., Biochim. Biophys. Acta, 80, 514 (1964).
123. Marmur J., Greenspan C. M., Science, 142, 387 (1963).
124. MacHattie L. A., Thomas C. A., Jr., Science, 144, 1142 (1964).
125. Fox E., Meselson M., J. Mol. Biol., 7, 583 (1963).
126. Brody E., et. al., J. Biol. Chem., 239, 285 (1964).
127. Cairns J., Nature, 194, 1274 (1962).
128. Loeb T., Zinder N. D., Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 282 (1961).
129. Davis J. E., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 6, 203 (1963).
130. Cooper S., Zinder N. D., Virology, 18, 405 (1962).
131. Strauss J. H., Jr., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 7, 43 (1963).
132. Mitra S., Enger M. D., Kaesberg P., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 68 (1963).
133. Gesteland R. F., Boedtker H., J. Mol. Biol., 8, 496 (1964).
134. Ellis D. B., Paranchych W., J. Cell and Comp. Physiol., 62, 207 (1963).
135. Feary T. W., Fischer E., Jr., Fisher Th. N., Biochem. Biophys. Res. Comm., 10, 359 (1963).
136. Weissman C., Borst P., Science, 142, 1188 (1963).
137. Kelly R. B., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 8, 602 (1964).
138. Weissman C., et. al., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 682 (1964).
139. Weissman C., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., Ochoa S., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 890 (1964).
140. Isaacs A., Advances in Virus Research, 10, 1 (1964).
141. Isaacs A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 27, 343 (1962).
142. Levy H. B., et. al., Life Sciences, 3, 204 (1963).
143. Ho M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112, 511 (1963).
144. Mandel H. G., Matthews A., Matus A., Ralph R. K., Biochem. Biophys. Res. Comm., 16, 604 (1964).
145. Burdon R. H., et. al., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 768 (1964).
146. Dulbecco R., Proc. Roy. Soc., B, 160, 423 (1964).
147. Dulbecco R., Viruses, Nucleic Acids and Cancer, p. 271, Baltimore, Williams and Wilkins (1963).
148. Orth G., Atanasiu P., Boiron M., Rebiere J. P., Paoletti C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115, 1090 (1964).
149. Crawford L., et. al., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 148 (1964).
150. Burke D. C., Biochem. J., 94, 2P (1965).
151. Hayes W., The Genetics of Bacteria and their Viruses, Oxford, Blackwell, 1964. (Хейс У., Генетика бактерий и бактериофагов, М., «Мир», 1965.)

ГЛАВА X

БИОСИНТЕЗ МОНОНУКЛЕОТИДОВ

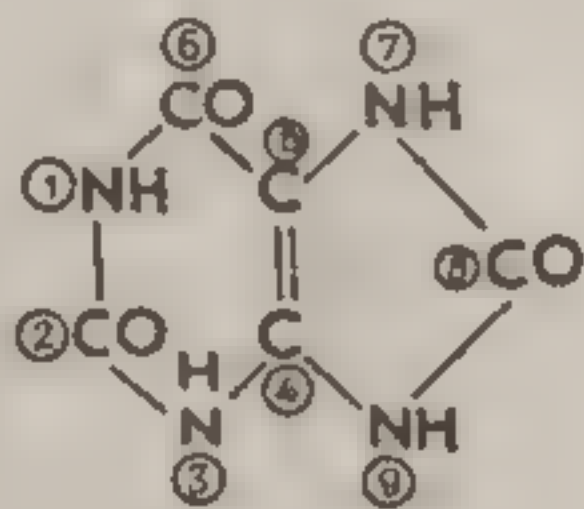
Введение

Изучение биосинтеза нуклеиновых кислот сводится к изучению нескольких отдельных процессов — биосинтеза пуриновых и пиримидиновых колец, возникновения углеводного компонента и затем биосинтеза самих полинуклеотидов.

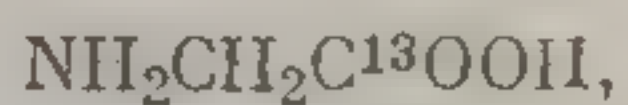
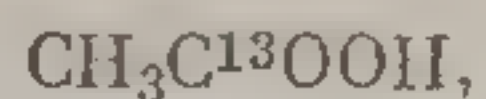
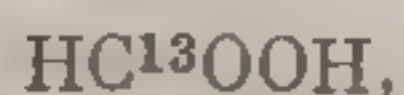
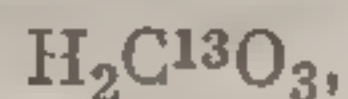
Биосинтез пуринов

Установлено, что при введении голубю лимоннокислого аммония, меченного N^{15} , изотоп обнаруживается в небольших количествах в нуклеиновых кислотах тканей, и в больших — в выделяющейся мочевой кислоте. Следовательно, изучая распределение изотопов азота и углерода в выделяемой мочевой кислоте у животных, получавших соединения, меченные этими изотопами, можно получить данные о механизме синтеза пуринового скелета.

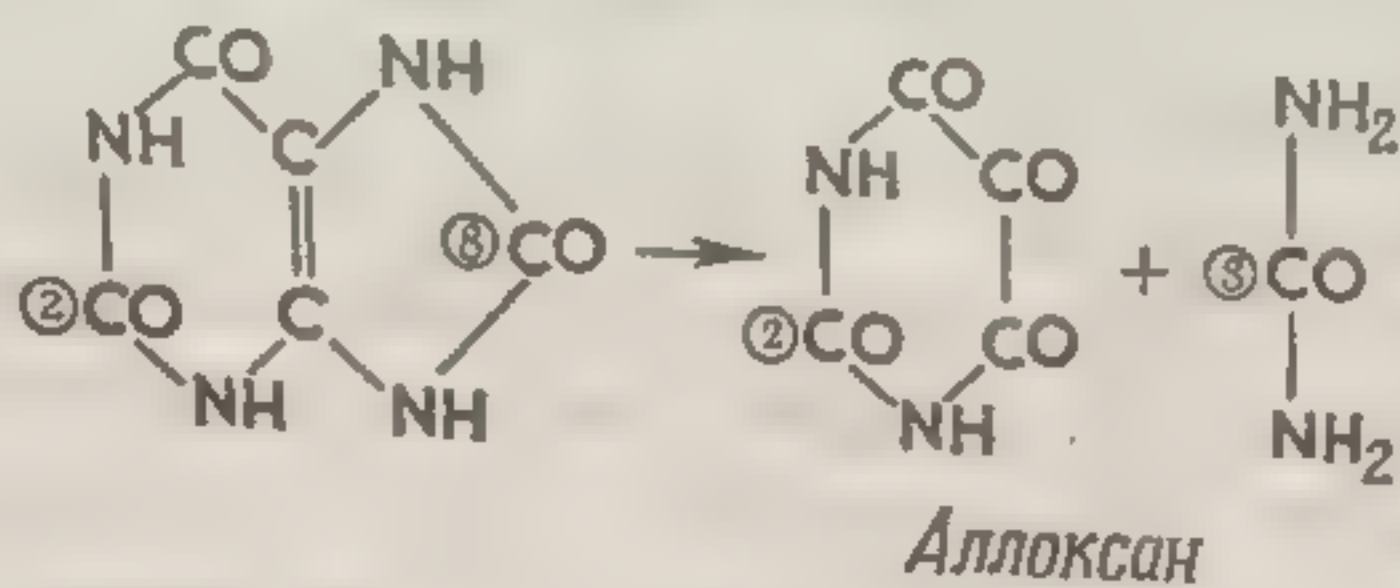
Чтобы проследить пути синтеза пуринового кольца после введения C^{13} или N^{15} , собирали выделяющуюся у голубей мочевую кислоту. Затем выделенную мочевую кислоту обрабатывали таким образом, чтобы отделить каждый атом кольца молекулы [1, 2].



В этих опытах были использованы следующие соединения:



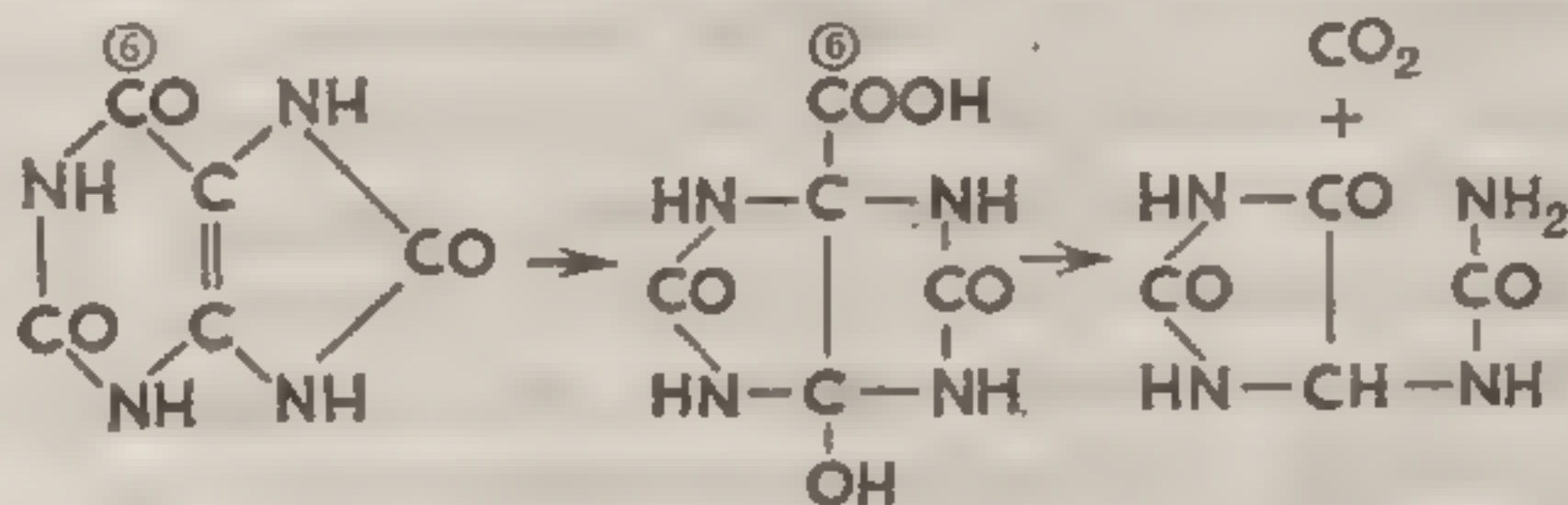
Затем действием KClO_3 и HCl мочевую кислоту разлагали на аллоксан и мочевины и тем самым углерод в положении 8 отделяли от остальных атомов углерода.



Расщепляя далее аллоксан, можно выделить еще одну молекулу мочевины, содержащую C-2. На 2 группы можно разбить и атомы азота, причем два атома азота окажутся связанными с C-8 и два атома с C-2.

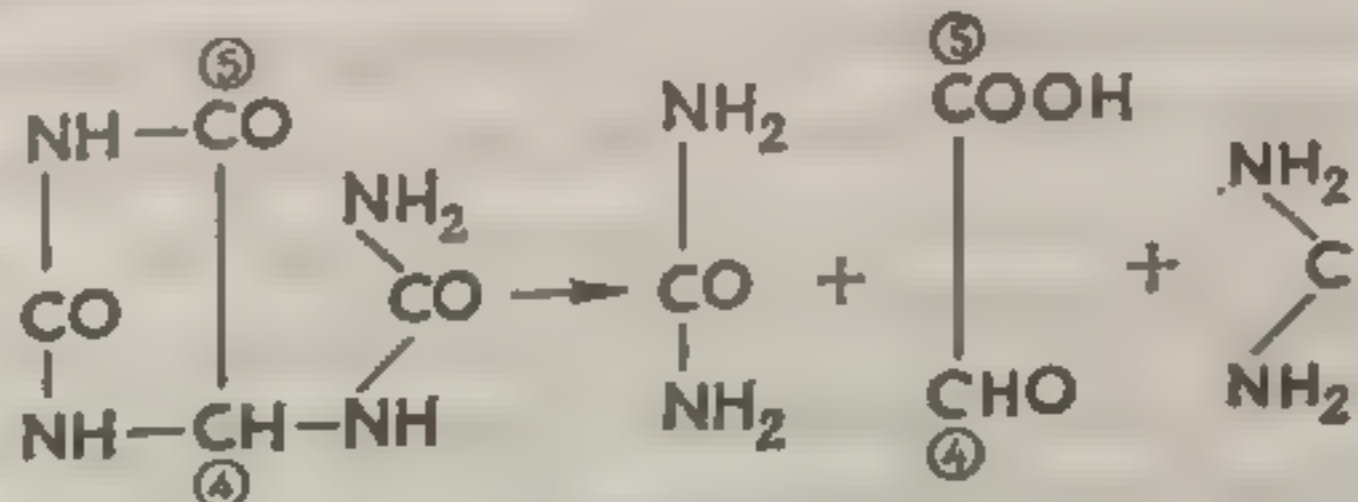
Из всех перечисленных соединений только муравьиная кислота служила источником C-2 и C-8, причем метка включалась в C-2 и C-8 пуринового кольца в равных количествах.

Чтобы установить происхождение остальных атомов углерода, был использован иной подход. Мочевую кислоту окисляли двуокисью марганца в щелочной среде до оксацетилендиуреидкарбоновой кислоты, имеющей симметричное строение. Затем, действуя на это соединение кислотой, превращали его в аллантоин и CO_2 , причем CO_2 происходил из C-6 пуринового кольца.



Из всех введенных голубям соединений только бикарбонат оказался источником углерода в положении 6. Этот факт наглядно демонстрирует существование до сих пор не известного механизма ассимиляции CO_2 .

Из аллантоина затем получали глиоксиловую кислоту и две молекулы мочевины.



Глиоксиловую кислоту превращали в семикарбазон, который окисляли перманганатом таким образом, чтобы вначале выделялся углекислый газ, возникший преимущественно из карбоксиль-

ного углерода глиоксиловой кислоты, т. е. из C-5. Позже начинал выделяться углекислый газ за счет атома C-4. Таким путем удалось показать, что глицин поставляет C-4 и C-5 атомы пуринового кольца, причем C-4 образуется за счет углерода карбоксильной группы глицина, а C-5— за счет α -углеродного атома.

Участие глицина в биосинтезе пуринового кольца нашло подтверждение при обследовании людей, получавших с пищей меченный N^{15} глицин [3]. После расщепления мочевой кислоты, выделенной из мочи таких людей, было обнаружено, что атом азота в положении 7 ведет свое происхождение прямо из аминогруппы глицина. Аналогичные данные были получены в опытах с дрожжами. В этих опытах дрожжи выращивали на среде с глицином, меченым N^{15} [4], затем из нуклеиновой кислоты извлекали гуанин и при его анализе нашли, что N-7 возник непосредственно из глицина.

Данные, описанные в начале этой главы [1, 2], были получены при изучении мочевой кислоты, собранной у голубей после скормливания им соединений, содержащих изотопы. Однако совершенно такая же схема биосинтеза пуринового кольца была получена в опытах с крысами, получавшими с пищей меченые предшественники [5], причем в данном случае исследовали пурины, выделенные непосредственно из тканевых нуклеиновых кислот.

Пути происхождения атомов азота, занимающих в пуриновом кольце положения 1, 3 и 9, были установлены в отдельной серии экспериментов [6]. Еще в 1936 г. было обнаружено [7], что в срезах печени голубя из соответствующих предшественников может синтезироваться гипоксантин (мочевая кислота не образуется из-за отсутствия в этой ткани ксантиноксидазы). Синтез гипоксантина может быть осуществлен также в гомогенате из печени голубя [8] и в надосадочной жидкости, полученной в результате скоростного центрифугирования гомогенатов [9].

При изучении такого экстракта было установлено, что на каждый 1 моль меченого гипоксантина, синтезированного из C^{14} -глицина, используются 2 моль амидного азота глутамина и 1 моль азота либо глутаминовой, либо аспарагиновой кислоты. Гипоксантин гидролизуют методами, позволяющими отделить друг от друга атомы азота, занимающие в пуриновом кольце положения 1, 3, 7 и 9. Тогда стало очевидно, что атомы N-3 и N-9 образуются из глутамина, а N-1— из аспарагиновой или глутаминовой кислоты [10, 11]. Чтобы выяснить, какая из этих аминокислот служит предшественником N-1, измеряли количество образовавшегося C^{14} -гипоксантина после инкубации ферментного препарата из печени голубя с C^{14} -глицином, CO_2 , формиатом, рибозо-5-фосфатом и АТФ. При добавлении глутамина, аспарагиновой или глутаминовой кислоты выход пурина увеличивался. Совместное вне-

сение аспарагиновой и глутаминовой кислот не усилило синтеза пурина; глутамин вместе с глутаминовой кислотой также не увеличили выхода гипоксантина. Однако добавление глутамина совместно с аспарагиновой кислотой привело к резкому усилению синтеза пурина. Этот факт наряду с другими доказательствами, которые будут приведены ниже, свидетельствует о том, что N-1 образуется за счет аспарагиновой кислоты.

Происхождение всех атомов пуринового кольца схематически показано на фиг. 52.

Механизм процесса «сборки» этих компонентов в пуриновое кольцо был подробно изучен в лабораториях Бьюксена и



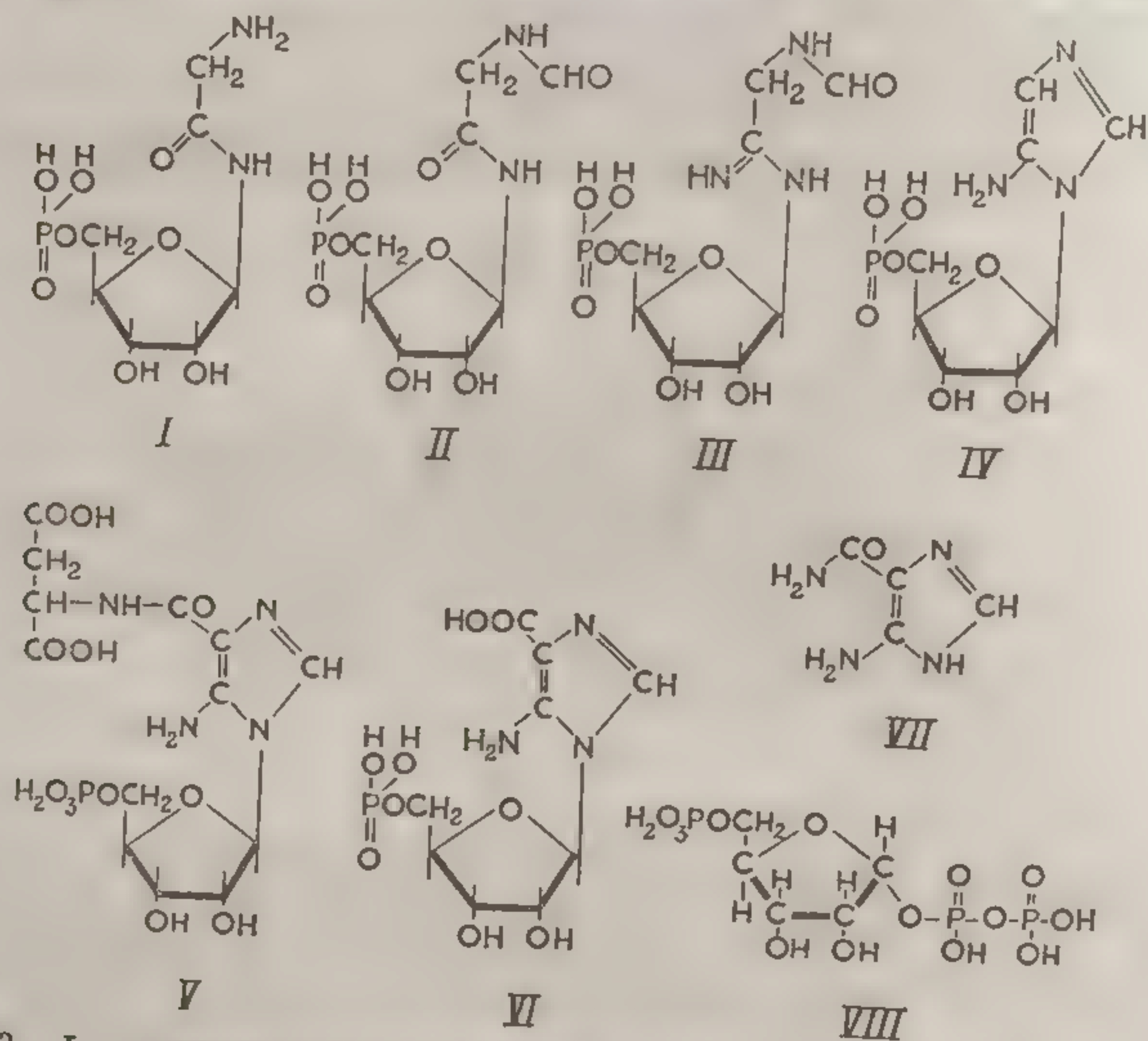
Фиг. 52.

Гринберга; имеющиеся данные собраны в многочисленные обзоры [6, 12—15, 73—75, 30]. Мы приведем здесь только их основные результаты. Большая часть исследований была выполнена на печени голубя; у млекопитающих этот процесс идет, по всей вероятности, таким же путем.

В 1950 г. была проведена серия экспериментов [16] с гомогенатом печени голубя. В реакционную смесь наряду с C^{14} -формиатом, участвующим в образовании гипоксантина, вносили меченые инозин и инозиновую кислоту (ИМФ). По соотношению удельной радиоактивности всех перечисленных соединений было установлено, что ИМФ является предшественником инозина и гипоксантина. Следовательно, рибоза и фосфат должны каким-то образом присоединяться к предшественнику пурина еще до того, как завершится формирование полного пуринового кольца.

Этот предшественник ориентировочно был идентифицирован как 5-амино-4-имидазолкарбоксамид (АИКА). Формула его показана на фиг. 53. Соединение это впервые было выделено и очищено из культуры *E. coli*, обработанной сульфамидами [17]. Хотя у многих микроорганизмов C^{14} -карбоксамид либо очень плохо используется, либо совсем не используется, он может превращать-

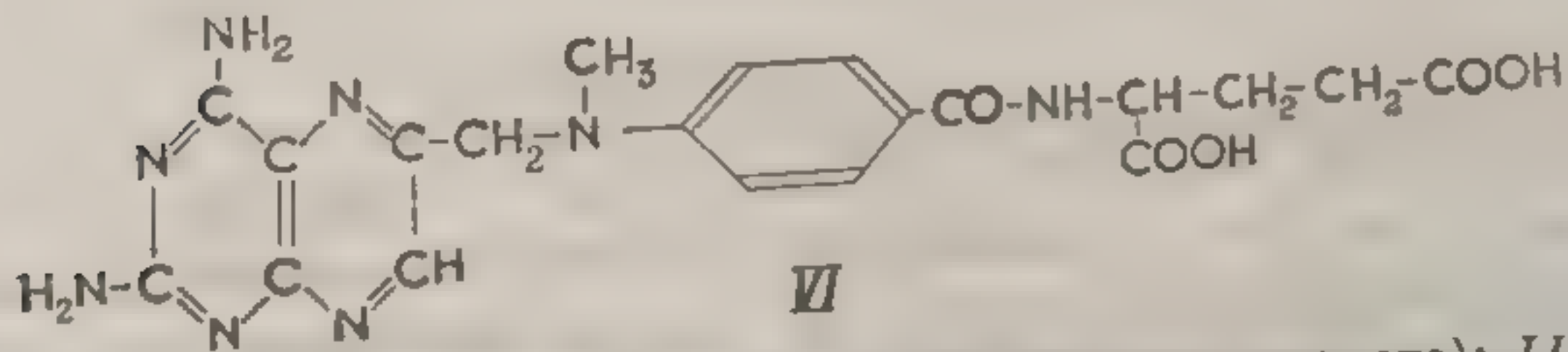
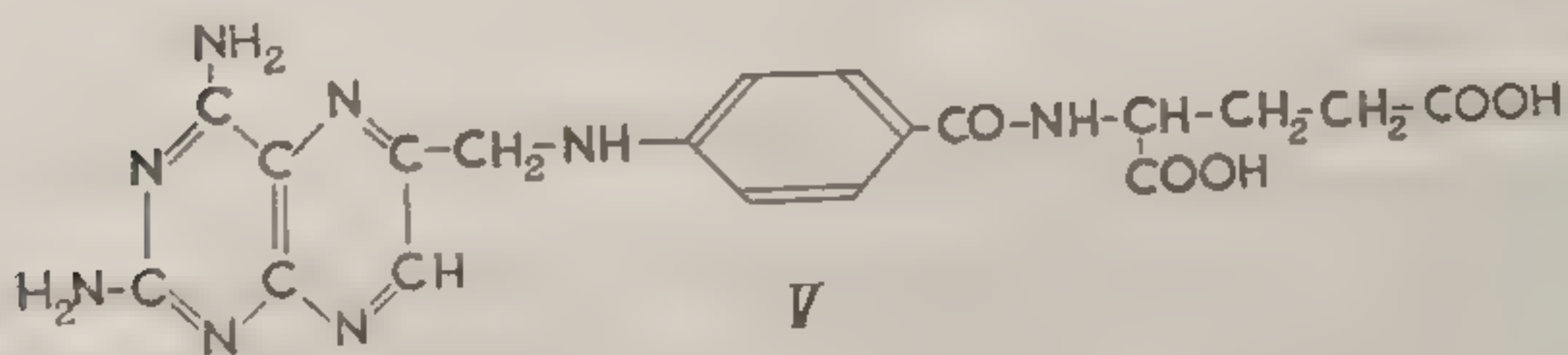
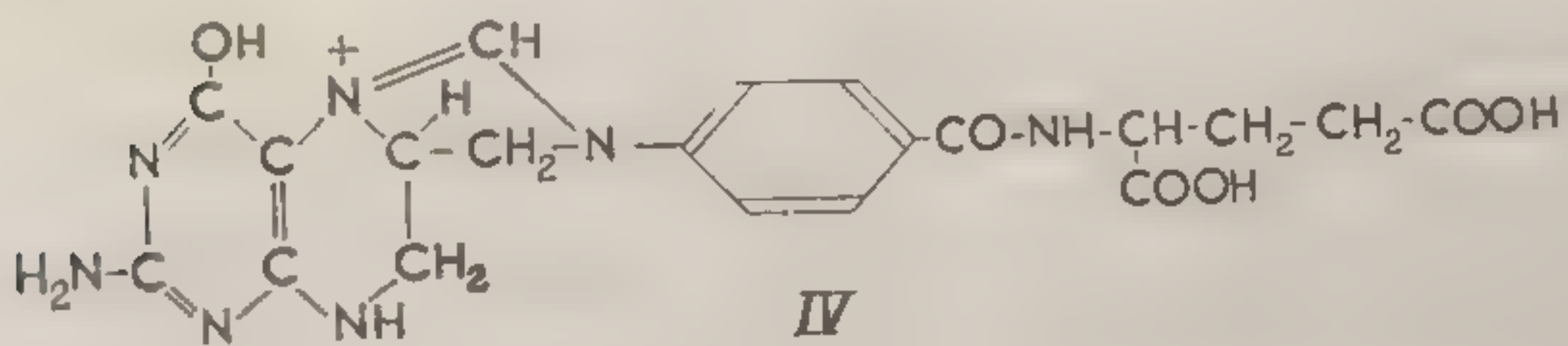
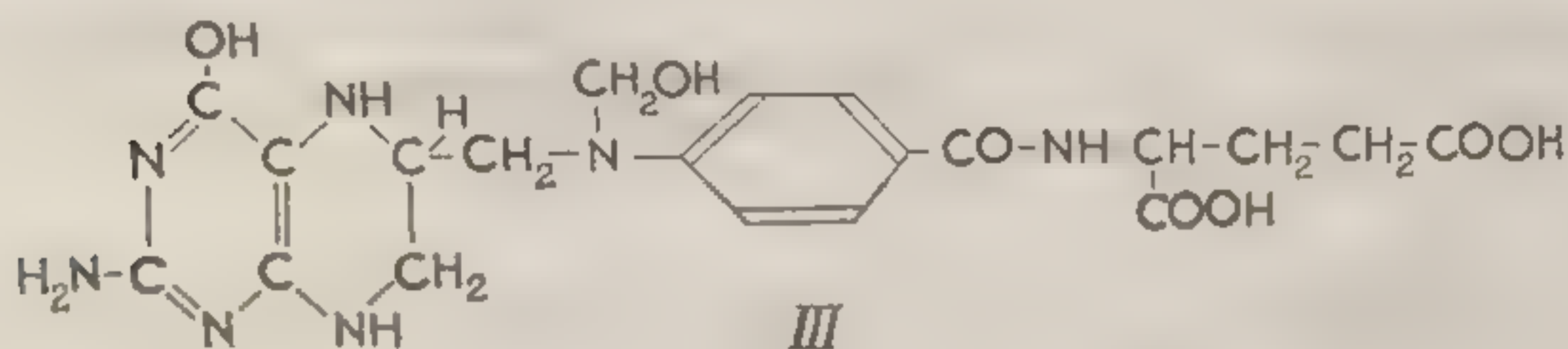
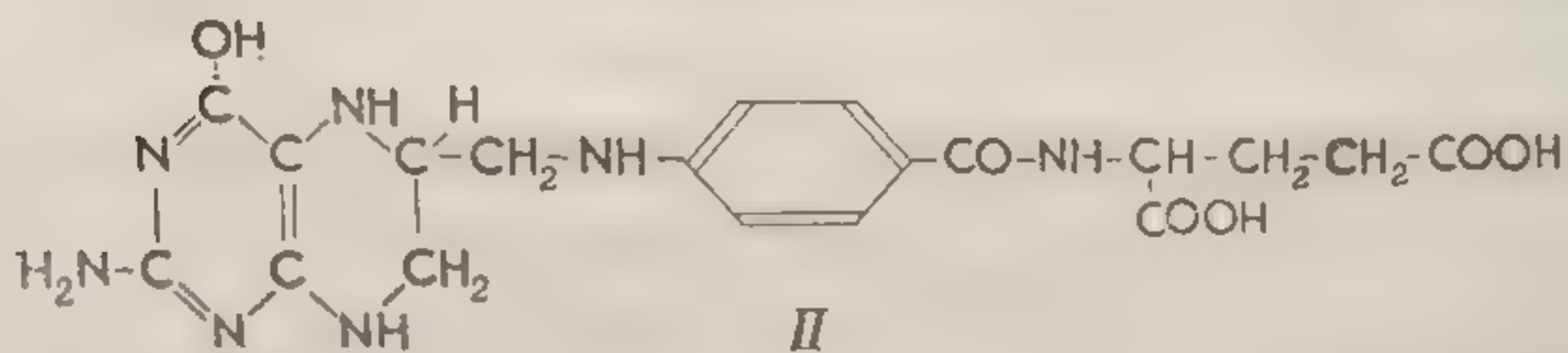
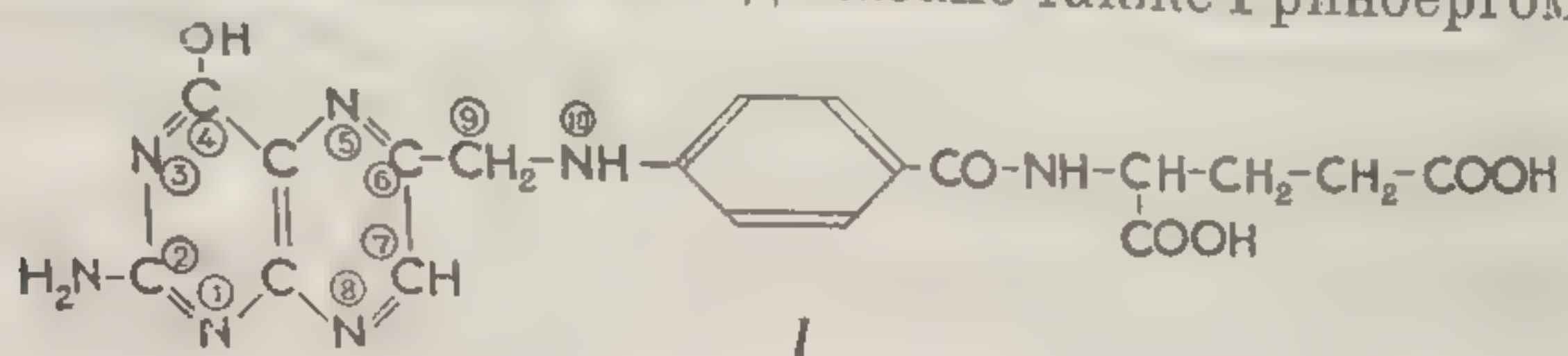
ся в пурины нуклеиновых кислот у крысы и в мочевую кислоту у голубя. При инкубации с гомогенатом печени голубя он полностью превращается в гипоксантин [18, 19], причем на каждый 1 моль синтезированного пурина включается 1 моль формиата. Было также показано, что АИКА превращается в ИМФ еще до того, как последний под действием фермента становится гипоксантином. Из приведенных результатов следует, что, хотя сам АИКА



Фиг. 53. I — глицинамидрибонуклеотид (ГАР); II — формил-ГАР; III — формил-ГАМ; IV — 5-аминоимидазолрибонуклеотид; V — сукцино-АИКАР; VI — карбокси-АИР; VII — 5-амино-4-имидазолкарбоксамид; VIII — ФРПФ.

не является предшественником, он превращается в 5-амино-4-имидазолкарбоксамидрибонуклеотид (АИКАР), который, очевидно, и представляет собой реально существующее промежуточное звено в биосинтезе пуринов. Эта точка зрения подтверждается тем, что в печени голубя обнаружена ферментная система, трансформилаза инозиновой кислоты (карбоксамида-рибонуклеотид-трансформилаза), катализирующая включение C^{14} -формиата в ИМФ в положение 2 [20]. Гипоксантин и инозин не используются в качестве субстратов в этой реакции. Следовательно, ИМФ превращается в АИКАР, который, присоединив к себе C^{14} -формиат с помощью производного тетрагидрофолевой кислоты (ТГФ) как кофактора (фиг. 54), вновь образует ИМФ, но меченный уже в положении 2

(фиг. 55). Присоединение формильного остатка к АИКАР, приводящее к образованию ИМФ, было доказано также Гринбергом [21, 22].

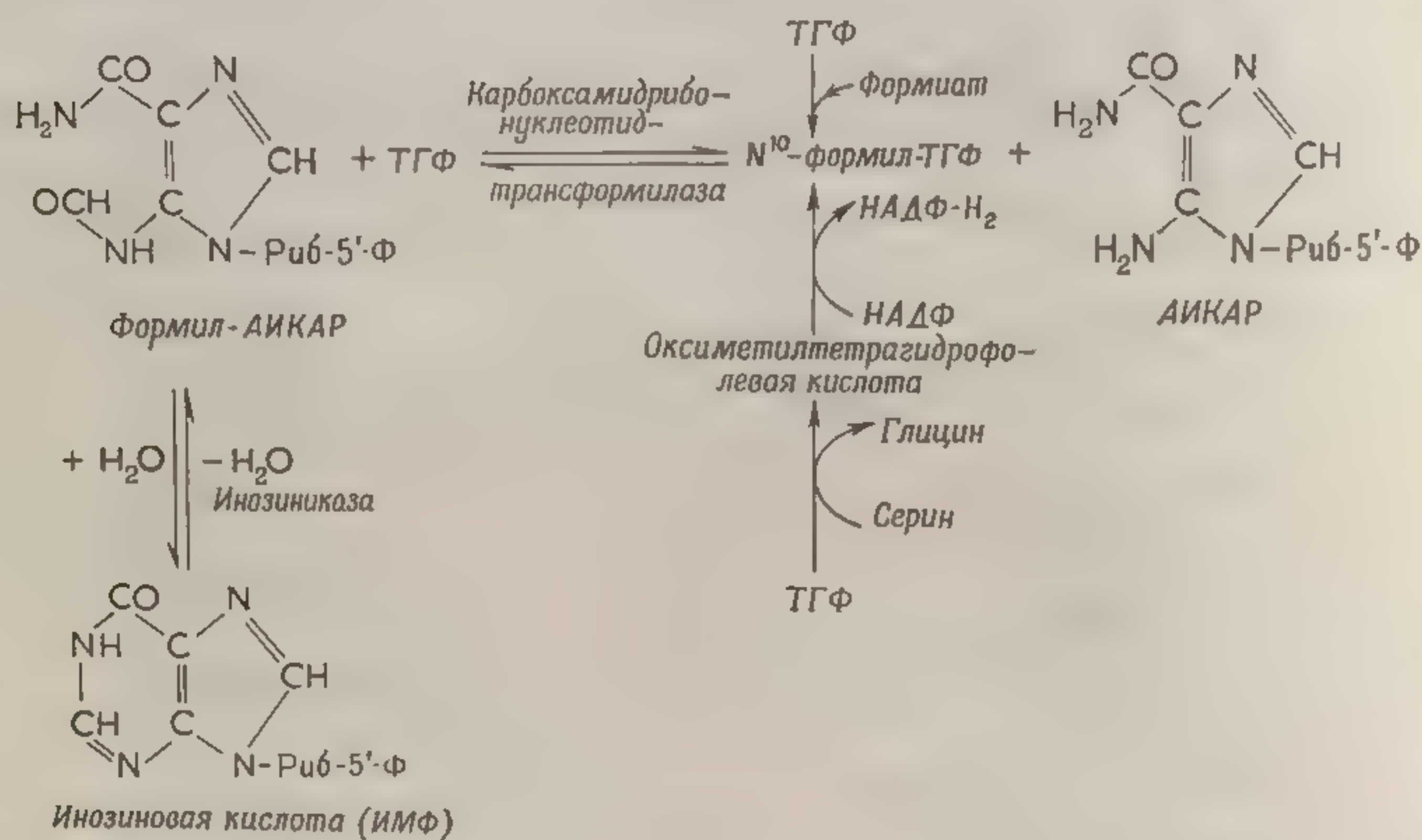


Фиг. 54. I — фолевая кислота (птероилглутаминовая кислота); II — тетрагидрофолевая кислота; III — оксиметилтетрагидрофолевая кислота; IV — N⁵,N¹⁰-ангидроформил-ТГФ; V — аминоптерин (4-аминоптероилглутаминовая кислота); VI — аметоптерин (4-аминометилптероилглутаминовая кислота).

Тетрагидрофолевая кислота, производное фолевой кислоты (фиг. 54), играет очень важную роль в биосинтезе как пуринов,

так и пиримидинов, поскольку она участвует в присоединении одноуглеродных остатков. В присутствии фермента *ТГФ-формилазы* и АТФ формиат реагирует с ТГФ, образуя N^{10} -формил-ТГФ (фиг. 55), которая также может быть получена из серина и ТГФ через оксиметил-ТГФ (фиг. 54).

N^{10} -формил-ТГФ может формилировать АИКАР (фиг. 55). Кроме того, с помощью фермента *циклогидролазы* от может обратно превратиться в N^5, N^{10} -ангидроформил-ТГФ (фиг. 55), который,



Фиг. 55.

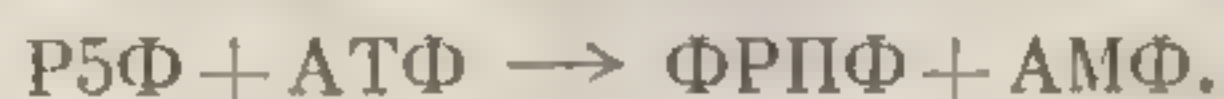
как мы увидим на стр. 173, ответствен за формилирование глицинамидрибонуклеотида (ГАР).

Рассмотрим теперь возможные предшественники АИКАР. Рибозо-5-фосфат, АТФ, формиат, глутамин и глицин в присутствии экстракта из печени голубя образуют два соединения [23], идентифицированные как глицинамидрибонуклеотид (ГАР) и формил-глицинамидрибонуклеотид (формил-ГАР). При использовании ферментной системы из печени голубя оба соединения (фиг. 53) показали себя как превосходные предшественники инозиновой кислоты. Например, формил-ГАР можно превратить в ИМФ, если неочищенную спиртовую фракцию из экстракта печени голубя инкубировать с субстратами: глутамином, CO_2 , аспарагиновой кислотой, АТФ и источником формильных групп. В отсутствие соответствующих субстратов накапливались два промежуточных соединения. Если из среды исключали источник формильных групп, наблюдалось образование АИКАР. Если же в реакционную смесь не вводили CO_2 , аспарагиновую кислоту и формиат, то

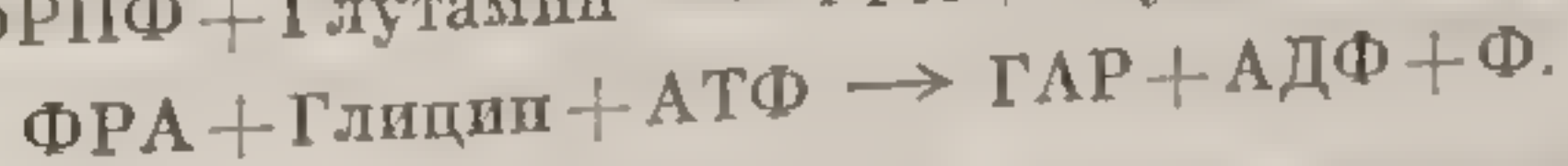
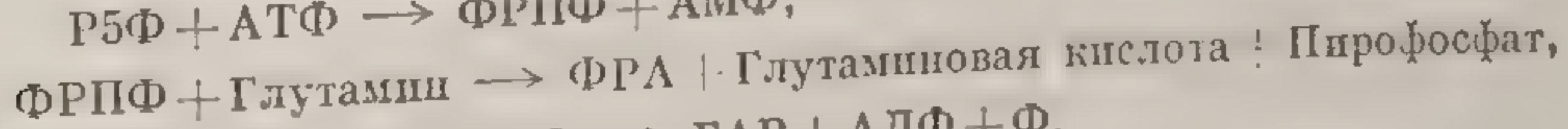
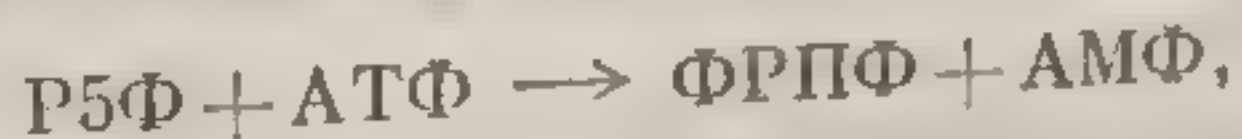
накапливалось новое соединение — АИР, т. е. 5-аминоимидазол-рибонуклеотид (см. стр. 174).

Фракционирование ферментных систем, присутствующих в экстракте из печени голубя, позволило найти новые промежуточные звенья и выяснить подробности реакций, приводящих к биосинтезу ИМФ [6]. Таким путем [31, 32] были выделены и идентифицированы два новых промежуточных продукта (фиг. 53): α -N-формилглицинамидирибонуклеотид (формил-ГАМ) и 5-амино-4-имидазол-(N-сукцинилкарбоксамид)-рибонуклеотид (сукцино-АИКАР).

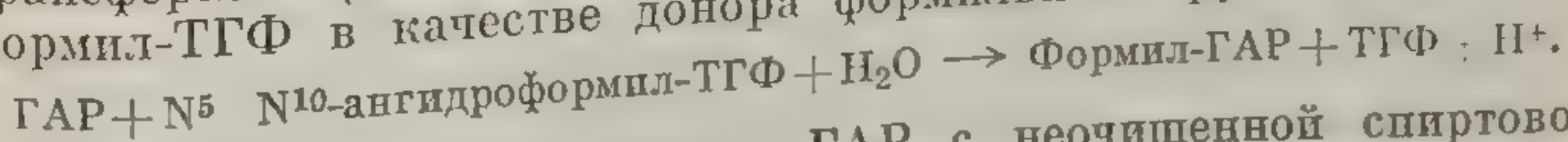
Прежде чем обсуждать всю схему биосинтеза пуринов, следует упомянуть еще один промежуточный продукт, 5-фосфорибозилпирофосфат (ФРПФ), формула которого приведена на фиг. 53. Он был идентифицирован [25, 26] как продукт реакции между рибозо-5-фосфатом (Р5Ф) и АТФ, протекающей при участии фермента *рибозофосфат-пирофосфокиназы* (К.Ф., 2.7.6.1):



ФРПФ, АТФ, глицин и глутамин вступают в реакцию в присутствии по меньшей мере двух разных ферментных фракций и образуют ГАР [24, 27—29]. Важно отметить, что 5-фосфорибозил-1-пирофосфат как источник рибозы незаменим в образовании ГАР. Еще важнее указать, что участие АТФ в ходе этих реакций приходится совершенно не на те точки, в которых она реагирует, принимая участие в синтезе ФРПФ. В перасфракционированном ацетоновом порошке из печени голубя ФРПФ и глутамин вступают в реакцию [27, 33], образуя глутаминовую кислоту и 5-фосфорибозиламин (ФРА, или NH_2 -Р5Ф). ФРА непосредственно реагирует с АТФ и глицином с образованием ГАР. Синтез ГАР в экстракте из печени голубя протекает в два этапа. Первый этап заключается в образовании ФРА при участии *амидофосфорибозил-трансферазы* (К. Ф., 2.4.2.14), а второй — во взаимодействии ФРА с глицином под действием *фосфорибозилглицинамид-синтетазы* (К. Ф., 6.3.1.3):

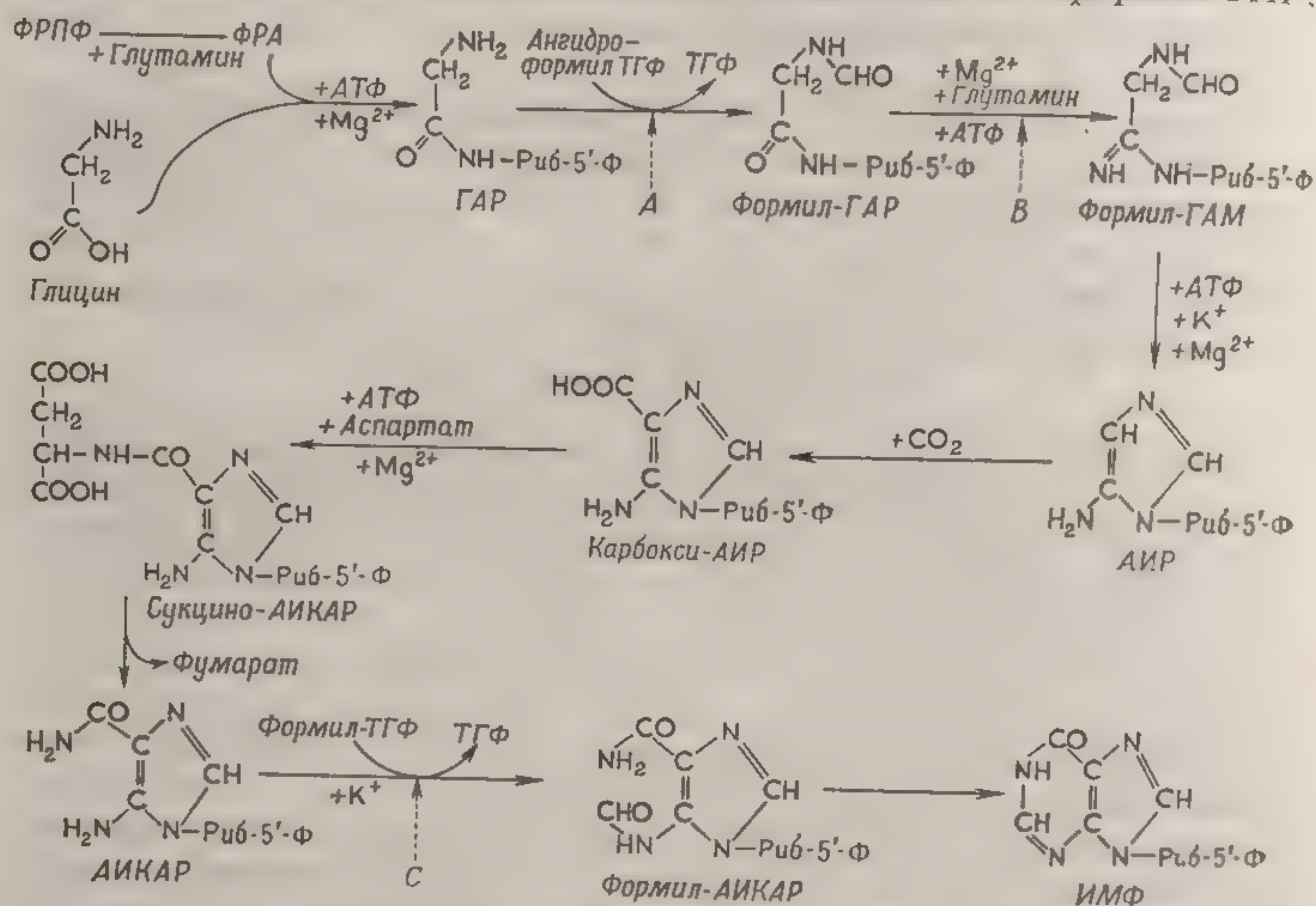


Формирование ГАР, т. е. превращение его в формил-ГАР, осуществляется ферментом *фосфорибозилглицинамид-формил-трансферазой* (К. Ф., 2.1.2.2.) с использованием N^5, N^{10} -ангидроформил-ТГФ в качестве донора формильных групп [34]:



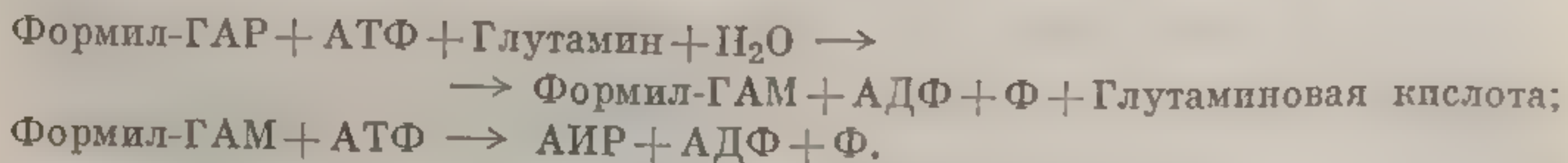
Если инкубировать формил-ГАР с неочищенной спиртовой фракцией печени голубя в присутствии АТФ и глутамина, обра-

зуется неустойчивое соединение АИР, т. е. 5-аминоимидазолрибонуклеотид (фиг. 53). АИР дает интенсивную оранжевую окраску на ароматические амины по Бреттону — Маршаллу с максимумом поглощения при 500 м.м. По этому признаку АИР отличают от АИКАР, который в таких же условиях образует соединение пурпурного цвета с максимумом поглощения при 540 м.м. Ферментная система, осуществляющая эти реакции, была разделена на два компонента. При инкубации компонента I с формил-ГАР,



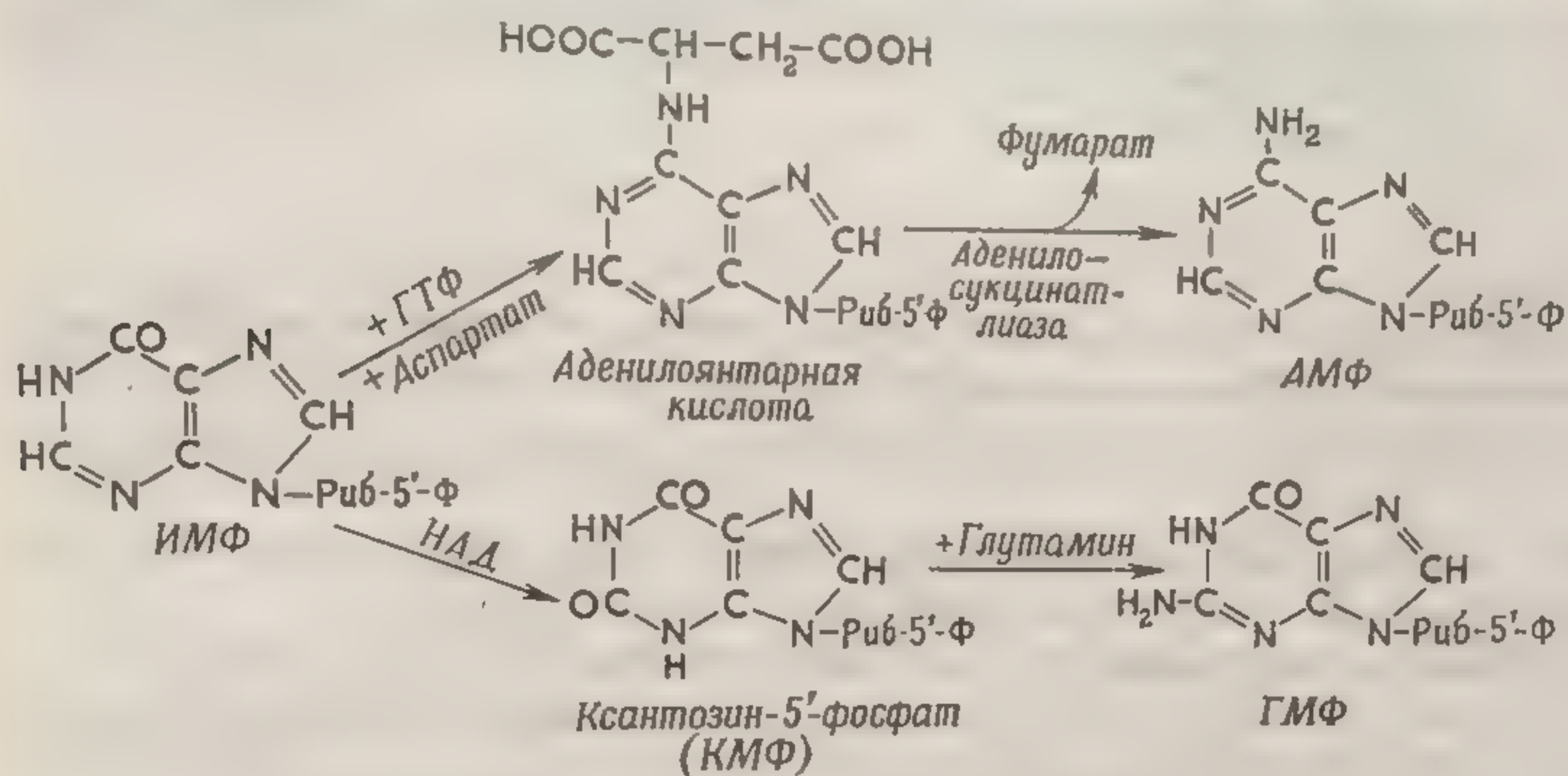
Фиг. 56. Путь биосинтеза пуринов.

глутамином, АТФ и ионами магния наблюдали образование нового промежуточного продукта, α-формил-глицинамидирибонуклеотида (формил-ГАМ). Под действием компонента II в присутствии АТФ формил-ГАМ превращается в АИР. Для этой реакции необходимы ионы калия и магния. Приведем уравнения описанных реакций:



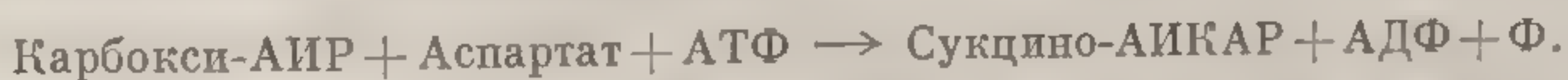
Если инкубировать АИР, АТФ, бикарбонат и аспарагиновую кислоту с неочищенной спиртовой вытяжкой из гомогената печени голубя, образуется АИКАР, т. е. 5-амино-4-имидазолкарбоксамидрибонуклеотид [32]. Реакция протекает в несколько этапов. Снача-

ла АИР реагирует с CO_2 или HCO_3^- — в присутствии *фосфорибозил-аминоимидазол-карбоксилазы* (К. Ф., 4.1.1.21) с образованием 5-амино-4-карбоксимидазолрибонуклеотида (карбокси-АМР). Он в свою очередь реагирует с аспарагиновой кислотой



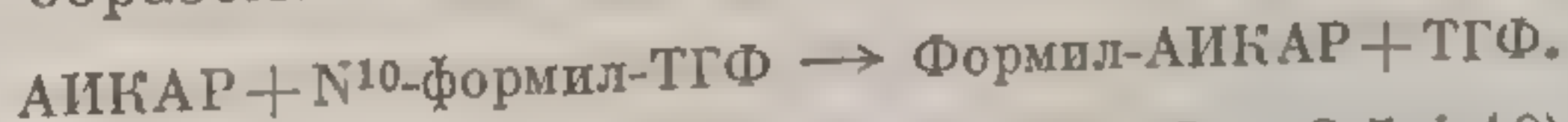
Фиг. 57.

и АТФ, образуя 5-амино-4-имидазол-(N-сукцинилкарбоксамид)-рибонуклеотид (сукцино-АИКАР):



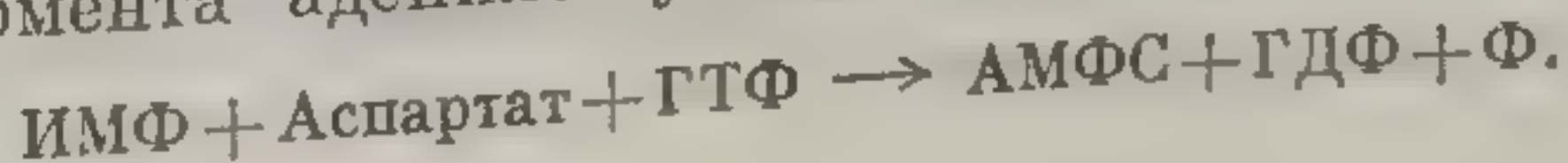
Сукцино-АИКАР (фиг. 53) затем превращается в АИКАР с выделением фумарата. Все перечисленные реакции биосинтеза пуринов изображены на фиг. 56.

Последний углеродный атом вводится в пуриновое кольцо путем формилирования АИКАР за счет N^{10} -формил-ТГФ [34] в присутствии *фосфорибозил-аминоимидазолкарбоксамид-формил-трансферазы* (К. Ф., 2.1.2.3). Реакция (фиг. 55) протекает следующим образом:



Под действием *ИМФ-циклогидролазы* (К. Ф., 3.5.4.10) кольцо формил-АИКАРа замыкается, и образуется инозиновая кислота (ИМФ), как это показано на фиг. 55.

Описанный путь синтеза приводит к образованию гипоксантина в виде его нуклеотида. АМФ синтезируется при взаимодействии в виде его нуклеотида. АМФ синтезируется при взаимодействии ИМФ с L-аспартатом через промежуточный продукт — аденило-сукцинат (АМФС) [38—41]. Реакция (фиг. 57) протекает при участии фермента аденило-сукцинат-синтетазы (К. Ф., 6.3.4.4):



ГТФ необходим как кофактор. АМФС затем распадается на АМФ и фумарат под действием *аденилосукцинат-лиазы* (К. Ф., 4.3.2.2):



На первом этапе превращения ИМФ в ГМФ происходит окисление ИМФ в ксантиловую кислоту (ксантозин-5'-фосфат, КМФ) в присутствии НАД и при участии *ИМФ-дегидрогеназы* (К. Ф., 1.2.1.14):



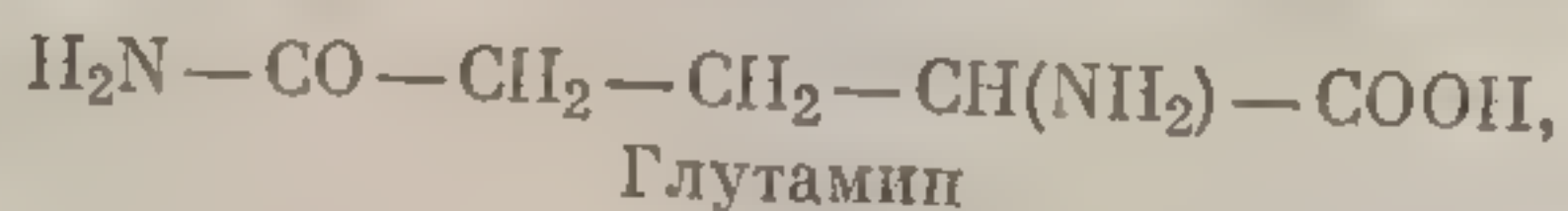
КМФ затем аминирован в присутствии глутамин и АТФ под влиянием *ГМФ-синтетазы* (К. Ф., 6.3.4.1) и дает ГМФ (фиг. 57):



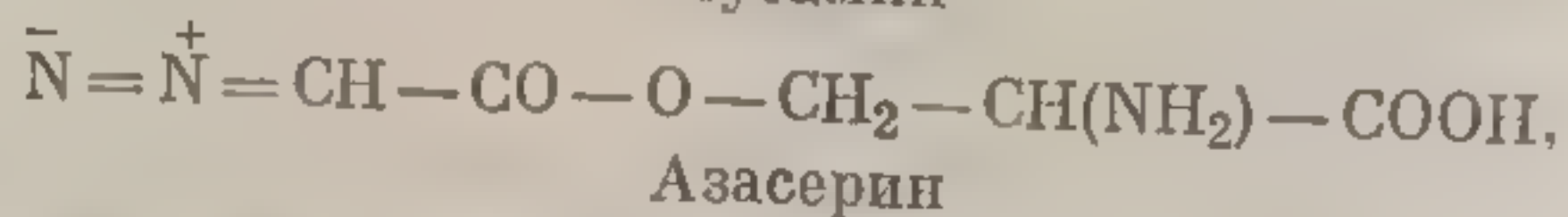
Источником азота в этой реакции может служить также и аммиак [91], однако он не так эффективен, как глутамин.

Весь путь биосинтеза пуринов показан на фиг. 56.

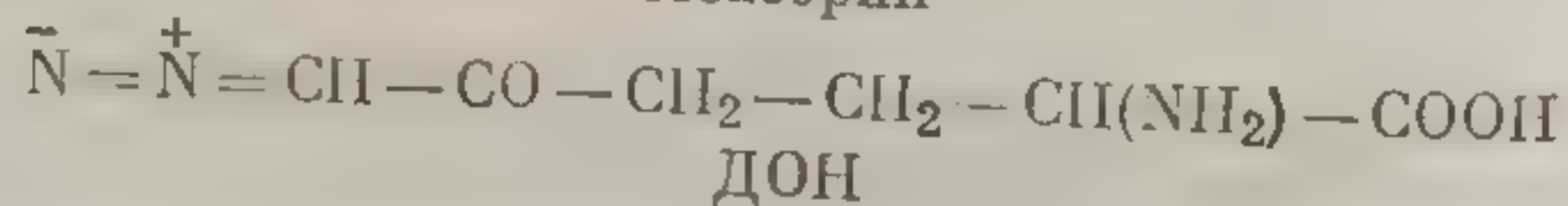
Роль глутамин здесь очевидна. Его антиметаболиты азасерин и 6-диазо-5-оксонорлейцин (ДОН) блокируют в положении В (фиг. 56) использование глутамин для биосинтеза пуринов.



Глутамин



Азасерин



ДОН

Оба соединения специфически тормозят превращение формил-ГАР в формил-ГАМ [37].

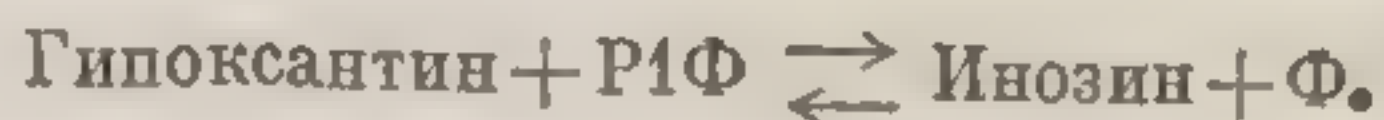
Более того, производные тетрагидрофолевой кислоты принимают участие во введении 2 и 8 углеродных атомов пуринового кольца (стрелки А и С на фиг. 56) и в биосинтезе метильной группы тимина (стр. 180). Поэтому нет ничего удивительного в том, что антагонисты фолевой кислоты препятствуют введению предшественников в молекулу нуклеиновой кислоты. В 1950 г. уже было показано [42], что *аминоптерин* и *аметоптерин* (фиг. 54) тормозят включение C^{14} -формиата в суммарную фракцию пуринов нуклеиновых кислот, выделенных из внутренних органов. Позднее опыты с лейкозными и нормальными клетками из внутренних органов мышей выявили, что *аметоптерин* тормозит использование C^{14} -формиата при синтезе пуринов как РНК, так и ДНК и при синтезе тимина ДНК [43]. Однако у мышей, у которых лейкозные клетки оказались устойчивыми к *аметоптерину* и даже нуждались в нем для оптимального роста, наблюдался обратный эффект:

аметоптерин усиливал включение C^{14} -формиата и в РНК и в ДНК лейкозных клеток и вместе с тем подавлял включение его в нуклеиновые кислоты тканей внутренних органов.

Применение антагонистов фолевой кислоты для лечения рака и родственных ему заболеваний связано со способностью этих соединений тормозить биосинтез нуклеиновых кислот [44].

Синтез нуклеотидов из пуринов

Пуриновые основания могут взаимодействовать с рибозо-1-фосфатами (Р1Ф), образуя нуклеозиды и неорганический фосфат [45]. Такие реакции, относящиеся к реакциям трансгликозидирования, обратимы и катализируются ферментами *нуклеозидфосфорилазами* (К. Ф., 2.4.2.1):



Вместо пуринов в этой реакции может участвовать 5-амино-4-имидазол-карбоксамид:



Если таким способом синтезированные нуклеозиды могли бы с помощью соответствующей фосфокиназы и АТФ стать фосфорилированными, то был бы открыт путь для биосинтеза рибонуклеотидов из предварительно синтезированных пуринов.

Однако для превращений пуриновых оснований в нуклеотиды гораздо важнее механизм с участием 5-фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ), о котором мы уже упоминали. При участии фермента, названного Корибергом [25] *нуклеотидпирофосфорилазой* (К. Ф., 2.4.2.7), основания реагируют с ФРПФ с образованием нуклеотидов и пирофосфата:

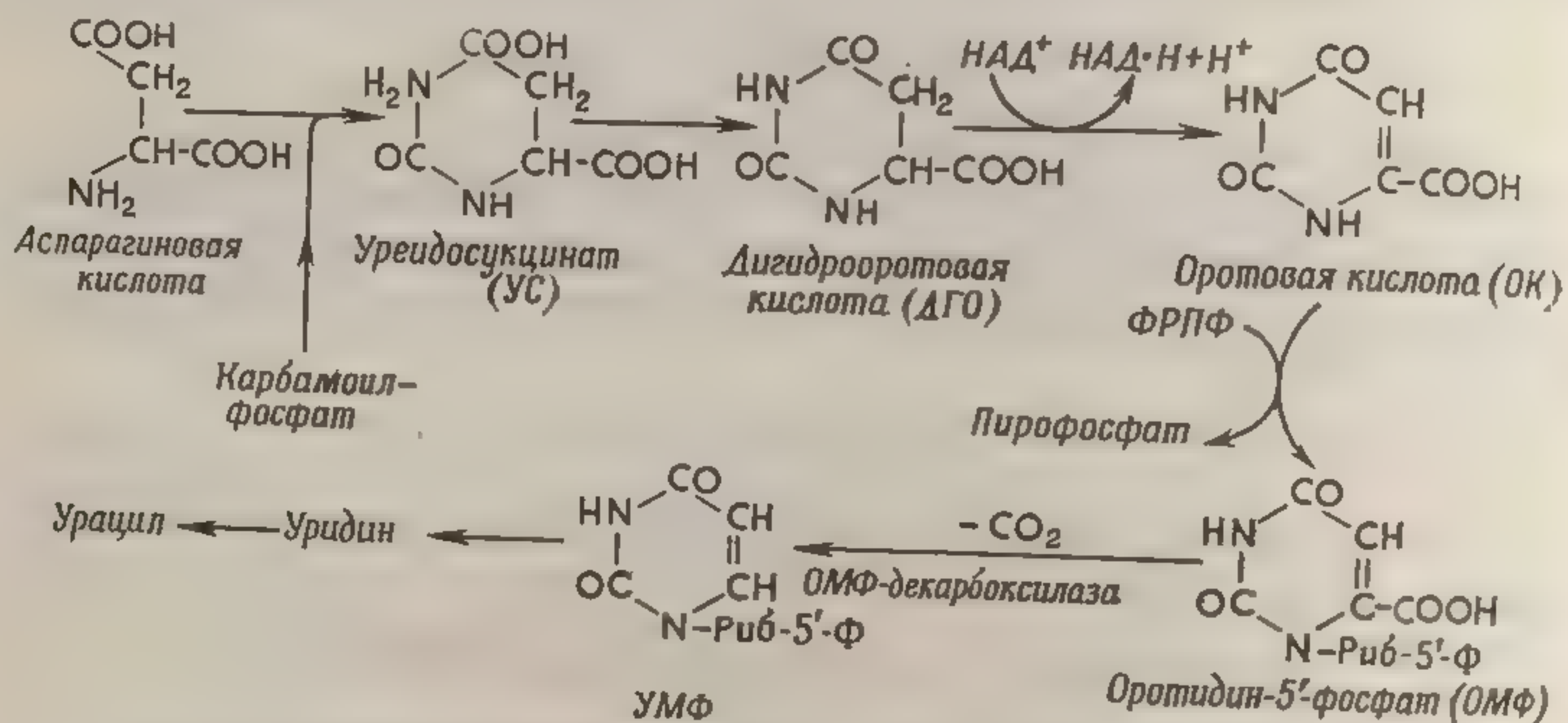


Известны две различные нуклеотидпирофосфорилазы: одна вызывает конденсацию аденина или карбоксамида, другая — гипоксантина, гуанина или 6-меркаптопурина [6]. Значение такого типа реакций для биосинтеза пиримидинов мы рассмотрим ниже.

Интересный механизм фосфорилирования нуклеозидов будет, возможно, найден в «нуклеозидтрансферазной» системе, описанной Брауэрманом и Чаргаффом [46]. Эти ферменты, обнаруженные у бактерий, животных и растений, катализируют перенос фосфору кислоты от органических фосфатов, принадлежащих к категории соединений, бедных энергией, на многие нуклеозиды, образуя при этом 5'-нуклеотиды.

Биосинтез пиримидинов

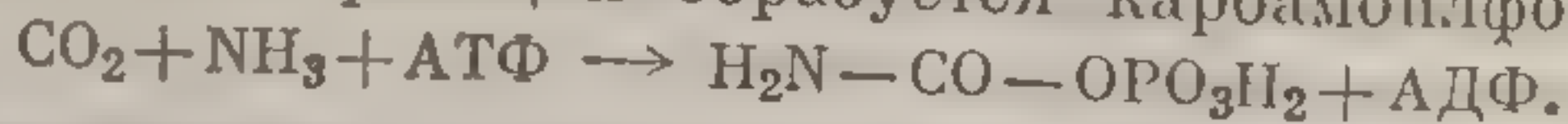
Путь биосинтеза пиримидинов (фиг. 58) был установлен главным образом на микроорганизмах и с использованием мутантов. Очевидно, так же синтезируются пиримидины в тканях млекопитающих. Описанию биосинтеза пиримидинов посвящен ряд обзоров [15, 47, 48, 74, 75].



Фиг. 58. Путь биосинтеза пиримидинов.

При анализе меченых пиримидиновых колец выяснилось, что N-3 возникает из аммиака, C-2 — из CO_2 , а C-4, C-5 и N-1 — из аспарагиновой кислоты. В опытах с возможными предшественниками пиримидина, содержащими изотопы, было установлено также, что путь биосинтеза пиримидинов проходит через уреидо-янтарную (карбамоил-аспарагиновая) и оротовую (урацил-6-карбоновая) кислоты [15, 49—51]. Этот механизм был детально изучен на бесклеточных системах, выделенных из печени или из бактерий.

Первый этап [52] заключается во взаимодействии CO_2 и аммиака в присутствии АТФ при участии карбаматкиназы (К. Ф., 2.7.2.2). В результате этой реакции образуется карбамоилфосфат (КФ):



КФ затем вступает в реакцию с аспарагиновой кислотой в присутствии аспарат-карбамоилтрансферазы (К. Ф., 2.1.3.2), что приводит к образованию уреидосукцината (УС), называемого также карбамоиласпаратом (КА) [53—55]. Ход этих реакций показан на фиг. 58.

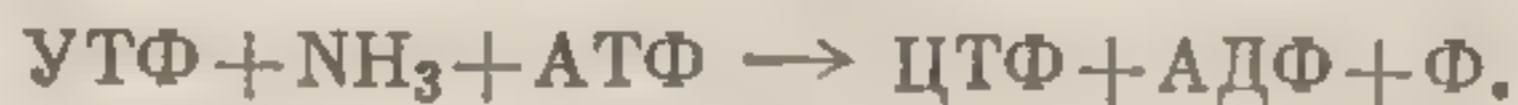
Далее под действием фермента дигидрооротазы (К. Ф., 3.5.2.3.), выделенной Либерманом и Корнбергом [49], УС замыкается в кольцо, что приводит к образованию дигидрооротовой кислоты (ДГО). Она в свою очередь окисляется дигидрооротатдегидрогеназой (К. Ф., 1.3.3.1.) с образованием оротовой кислоты (ОК).

Под влиянием *оротат-фосфорибозил-трансферазы* (К. Ф., 2.4.2.10.) в присутствии ионов Mg^{2+} оротовая кислота реагирует с ФРПФ [56], давая *оротидин-5'-фосфат* (5'-ОМФ). Он затем декарбоксилируется с помощью *оротидин-5'-фосфат-декарбоксилазы* (К. Ф., 4.1.1.23) и образуется *уридин-5-фосфат* (5-УМФ), как показано на фиг. 58.

Возможно существование и другого пути биосинтеза пиримидинов, проходящего через карбомил- β -аланин, соответствующие рибонуклеозид и рибонуклеотид и затем дигидроуридин-5'-фосфат [59]; в этом случае оротовая кислота не принимает участия в образовании пиримидинового кольца.

Биосинтез производных цитозина

Превращение урацила в цитозин происходит тогда, когда урацил уже содержит 3 молекулы фосфорной кислоты, т. е. на уровне трифосфосодержащих производных [60—92]. Реакцию осуществляет *ЦТФ-синтетаза* (К. Ф., 6.3.4.2):



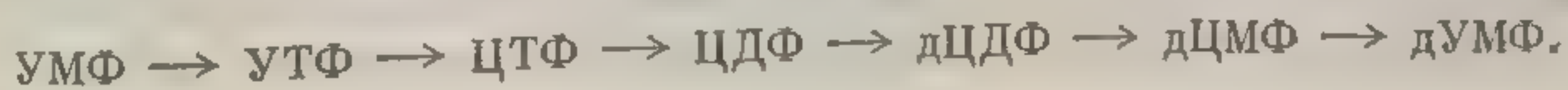
Биосинтез дезоксирибонуклеотидов

Образование дезоксирибозы из рибозы происходит на уровне нуклеотидов без предварительного расщепления гликозидной связи [66—68, 81—86, 89, 90]. На правильность этого предположения указывает следующий факт: при включении таких соединений, как, например, равномерно меченный C^{14} -цитидин в дЦМФ-остатки ДНК относительная радиоактивность углеводного компонента и основания не меняется. Превращение рибозы в дезоксирибозу протекает, очевидно, на уровне нуклеозиддифосфатов [76—80].

Экстракты из *E. coli* содержат две ферментные фракции; одна из них катализирует образование ЦДФ из ЦМФ, вторая восстанавливает ЦДФ в дЦДФ. Для этой реакции необходимо наличие АТФ, Mg^{2+} , НАДФ- H_2 и тиоредоксина [80]. Тиоредоксин — это кислый белок с низким молекулярным весом, состоящий из одной полипептидной цепи и имеющий одну S — S-связь (в цистине).

Возможно, что дАМФ и дГМФ также образуются за счет реакции восстановления, протекающей на уровне дифосфопроизводных [76].

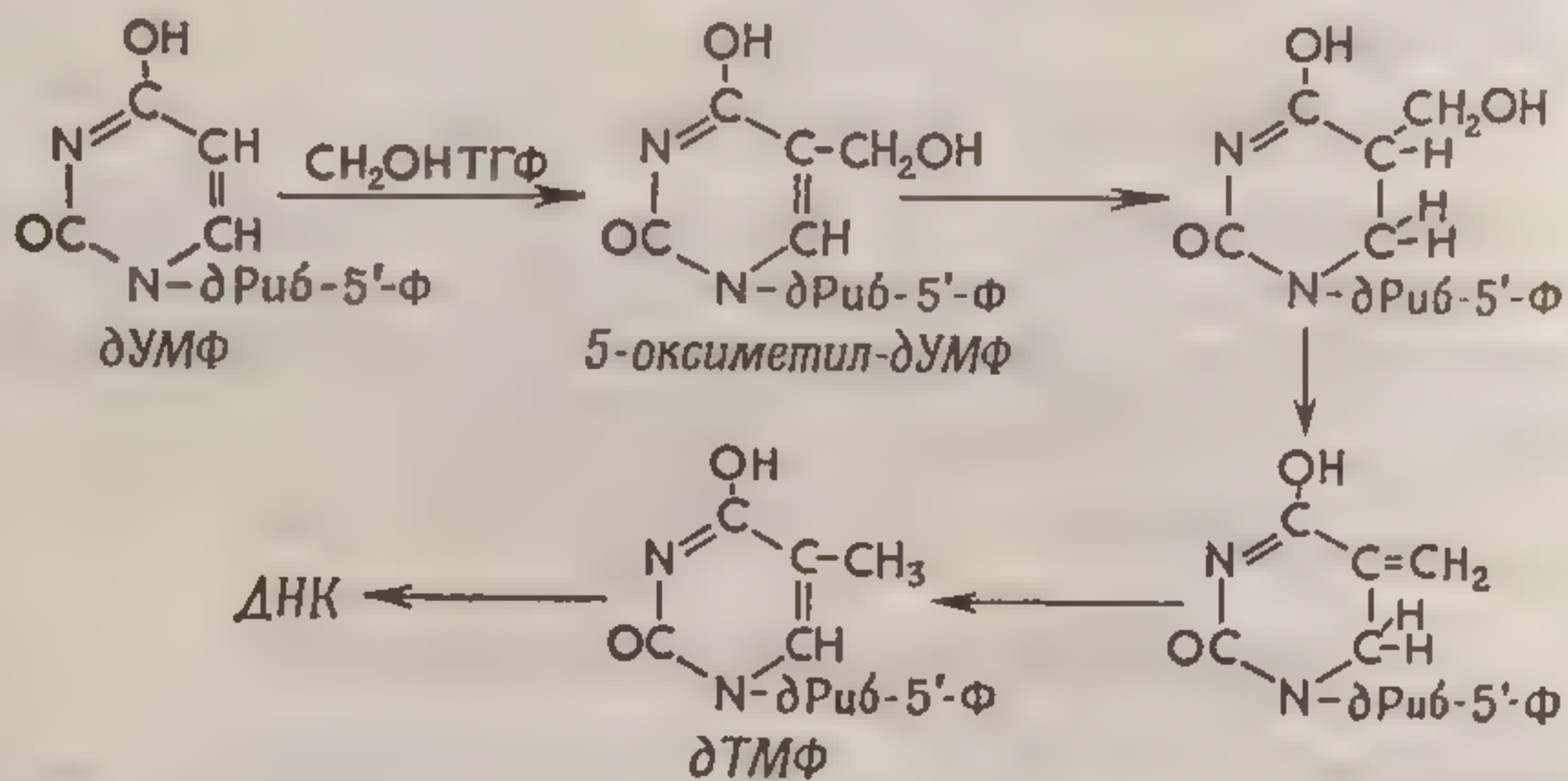
С другой стороны, дУМФ возникает в результате дезаминирования дЦМФ, осуществляемого дезоксицитидилатдеаминазой (стр. 185). Следовательно, весь путь превращения УМФ в дУМФ будет выглядеть следующим образом:



Биосинтез производных тимина

Существенным этапом в образовании тиминсодержащих нуклеозидов является метилирование дезоксиуридинмонофосфата (дУМФ), приводящее к образованию тимидинмонофосфата (ТМФ). Превращение дУМФ \rightarrow ТМФ осуществляется ферментной системой, обычно рассматриваемой как тимидилатсинтетаза. Процесс этот весьма сложен и протекает в несколько стадий.

Как было показано рядом авторов [62, 63], формиат и β -углеродный атом серина являются предшественниками метильной



Фиг. 59.

группы в положении 5. Опыты с L-серином- β -C¹⁴- α , β -H²-N¹⁵ [63] на крысах говорят о том, что включению не подлежат соединения с такой же степенью окисления, как формиат. Вместе с тем опыты с *E. coli* [64] показали, что формиат служит источником атомов C-2 и C-8 пуринового кольца, но не углерода метильных групп тимина.

Известно [65], что для синтеза тимидина необходима фолевая кислота; в работах Корнберга и других исследователей, о которых речь будет ниже, подчеркивается участие в этом процессе оксиметилтетрагидрофолевой кислоты (CH₂OH—ТГФ), формула которой приведена на фиг. 54.

C¹⁴-дезоксиуридин (но не 5-C¹⁴-метилуридин) включается в кольцо тимина [66, 79]. Можно было думать, что при биосинтезе тимина сам дезоксирибонуклеозид (или нуклеотид) служит акцептором одноуглеродного звена. Это предположение было затем окончательно подтверждено рядом авторов. Например, Корнберг [69] показал, что дУМФ, вступая в реакцию с CH₂OH—ТГФ образует тиминнуклеотид в присутствии фермента, выделенного из бактерий. Далее было установлено, что для синтеза тимидина из дезоксиури-

дина при участии серина или формальдегида необходимо присутствие тетрагидрофолевой кислоты [70, 71]. Имеется ряд доводов [71] в пользу прямого участия дезоксиуридин-5-фосфата в синтезе тимина; он является первичным акцептором одноуглеродного компонента. Как показано на фиг. 59, 5-оксиметилпиримидин оказывается промежуточным звеном в синтезе тимидиловой кислоты. В пользу такого хода реакции говорят опыты с нуждающимися в тимине мутантами *E. coli* [72]: их рост оказался возможным в присутствии соединения, образующегося при восстановлении 5-оксиметилдезоксиуридина.

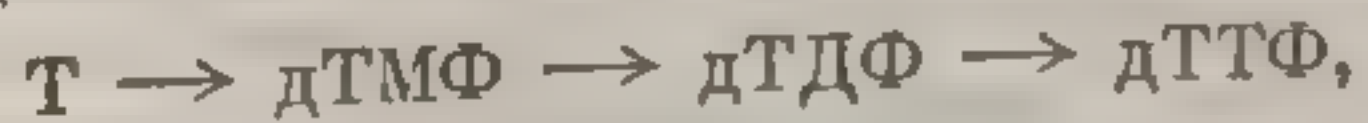
Вытяжки из *E. coli*, зараженной Т-четным фагом, содержат фермент дезоксицитидилатоксиметилазу, катализирующий образование 5-оксиметилдезоксицитидиловой кислоты из формальдегида и дезоксицитидиловой кислоты [88] в присутствии ТГФ (стр. 215).

Образование нуклеозидтрифосфатов

Субстратами для биосинтеза РНК и ДНК служат рибонуклеозид-5'-трифосфаты и дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты. Процесс катализируется РНК- и ДНК-полимеразами, которые рассматриваются в последующих двух главах. Сами нуклеозидтрифосфаты образуются из нуклеозидмонофосфатов под действием соответствующих киназ в присутствии АТФ. К некоторым киназам мы еще вернемся при дальнейшем изложении (стр. 185), а пока следует остановиться на таких важных ферментах, как киназы, превращающие тимидин (Т) в его трифосфат (ТТФ).

Тимидин легко включается в клетки, синтезирующие ДНК, поэтому включение меченого тимидина как специфического предшественника ДНК широко используется при изучении биосинтеза ДНК. Быстрое включение N^{15} -Т или C^{14} -Т непосредственно в ДНК было продемонстрировано на крысах [87], зародышах цыплят [93], клетках костного мозга [94], растущих клетках из кончика корня лука [95] и в культуре тканей [96]. При радиоавтографических исследованиях процесса воспроизведения хромосом недавно начали применять тимидин, меченный тритием [39, 97—100], обладающий особыми преимуществами. Ниже мы остановимся еще на использовании меченого тимидина при изучении биосинтеза ДНК в бесклеточных препаратах из тканей млекопитающих [101—105].

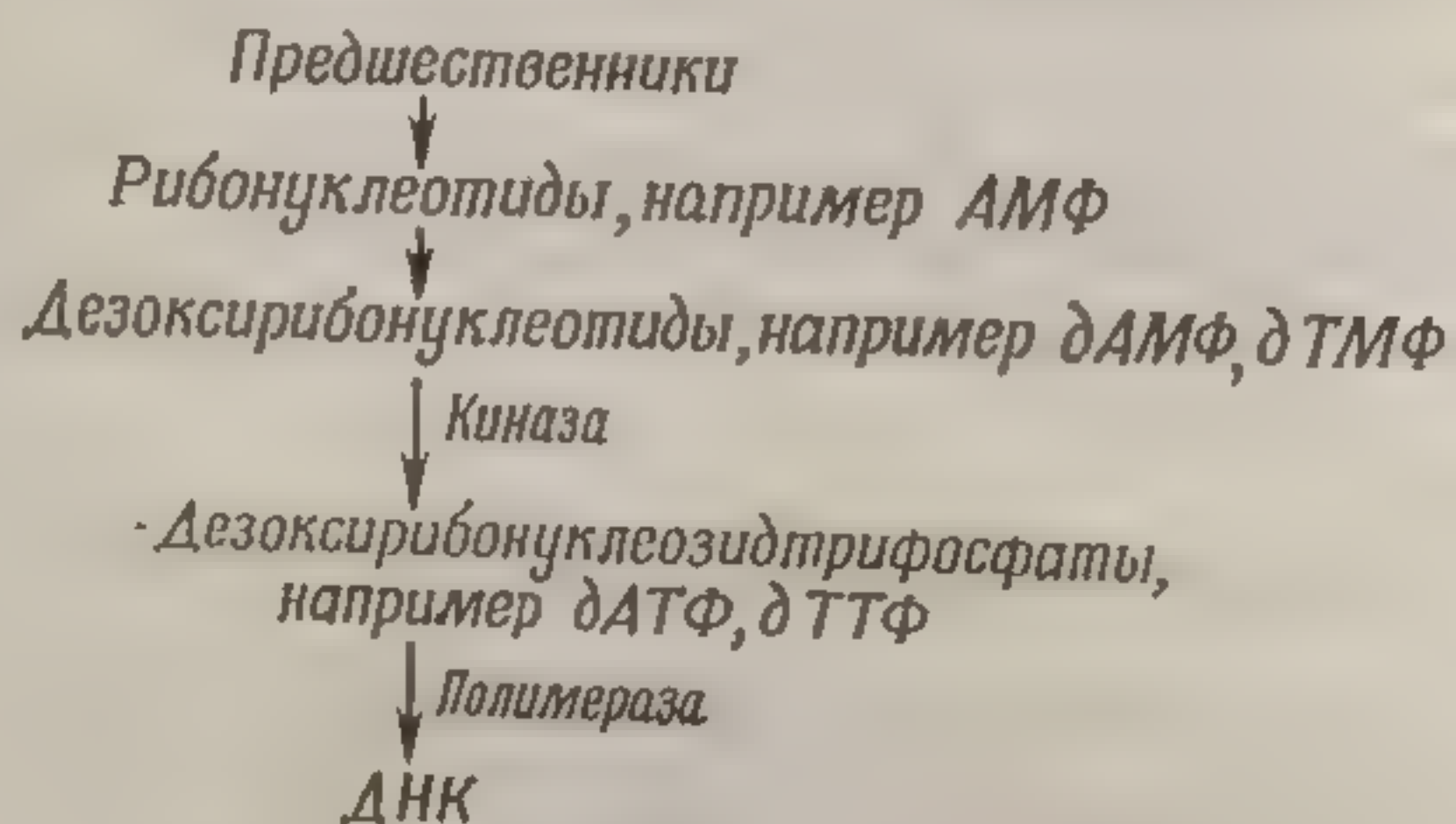
Включение тимидина в ДНК протекает в несколько стадий, в течение которых он подвергается с помощью ряда киназ (стр. 185) последовательному фосфорилированию до дТТФ:



причем каждый этап катализируется своей, отдельной киназой [106—108].

Регуляция биосинтеза нуклеотидов

Исследования, описанные в этой главе, ясно показывают, что образование нуклеотидов для биосинтеза нуклеиновых кислот является кульминационным моментом в длинной и сложной цепи тонко регулируемых ферментативных реакций [109—111]. В меньшей степени регуляция осуществляется на стадии полимеризации (стр. 208), в большей — на отдельных этапах синтеза нуклеозидов и их трифосфатов.



Фиг. 60. Этапы биосинтеза ДНК.

В процессе синтеза ДНК можно выделить 4 основных этапа:

1. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых рибонуклеозидмонофосфатов.
2. Превращение этих рибонуклеотидов в соответствующие дезоксирибонуклеотиды.
3. Фосфорилирование дезоксирибонуклеозидмонофосфатов до трифосфатов.
4. Полимеризация дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в полидезоксирибонуклеотид в присутствии соответствующей затравки ДНК (фиг. 60).

Механизм, регулирующий синтез ДНК, изучался главным образом на быстро растущих клетках и тканях, например на клонах клеток в культуре, на опухолях и на клетках регенерирующей печени. Хорошо известно, что при резекции средней и левой боковой долей печени у взрослой крысы оставшаяся часть начинает уже через несколько часов интенсивно регенерировать и через несколько дней достигает первоначального размера. Во время регенерации печени происходит быстрый рост клеток и их интенсивное деление, причем максимум митотической активности приходится примерно на 24 час после операции. В этот период синтез ДНК протекает очень быстро в отличие от нормальной печени, в которой ДНК практически не обновляется (стр. 312). Как только печень достигает первоначальных размеров, синтез ДНК осла-

бекает и прекращается. Поэтому на регенерирующей печени крысы очень удобно изучать механизмы регуляции ферментов, участвующих в биосинтезе ДНК.

Образование пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов регулируется хорошо известным механизмом обратной связи [57, 58, 112—114]. Положительную обратную связь можно представить себе, например, как выработку фермента в присутствии соответствующего субстрата. Положительная обратная связь характерна в первую очередь для явления адаптации ферментов, хорошо известного у микроорганизмов и достаточно распространенного у млекопитающих [115]. К явлению адаптации ферментов мы вернемся несколько позже (стр. 286).

Если имеет место отрицательная обратная связь, то продукты ряда ферментативных реакций могут воздействовать либо на активность, либо на содержание одного или нескольких ферментов в этой цепи.

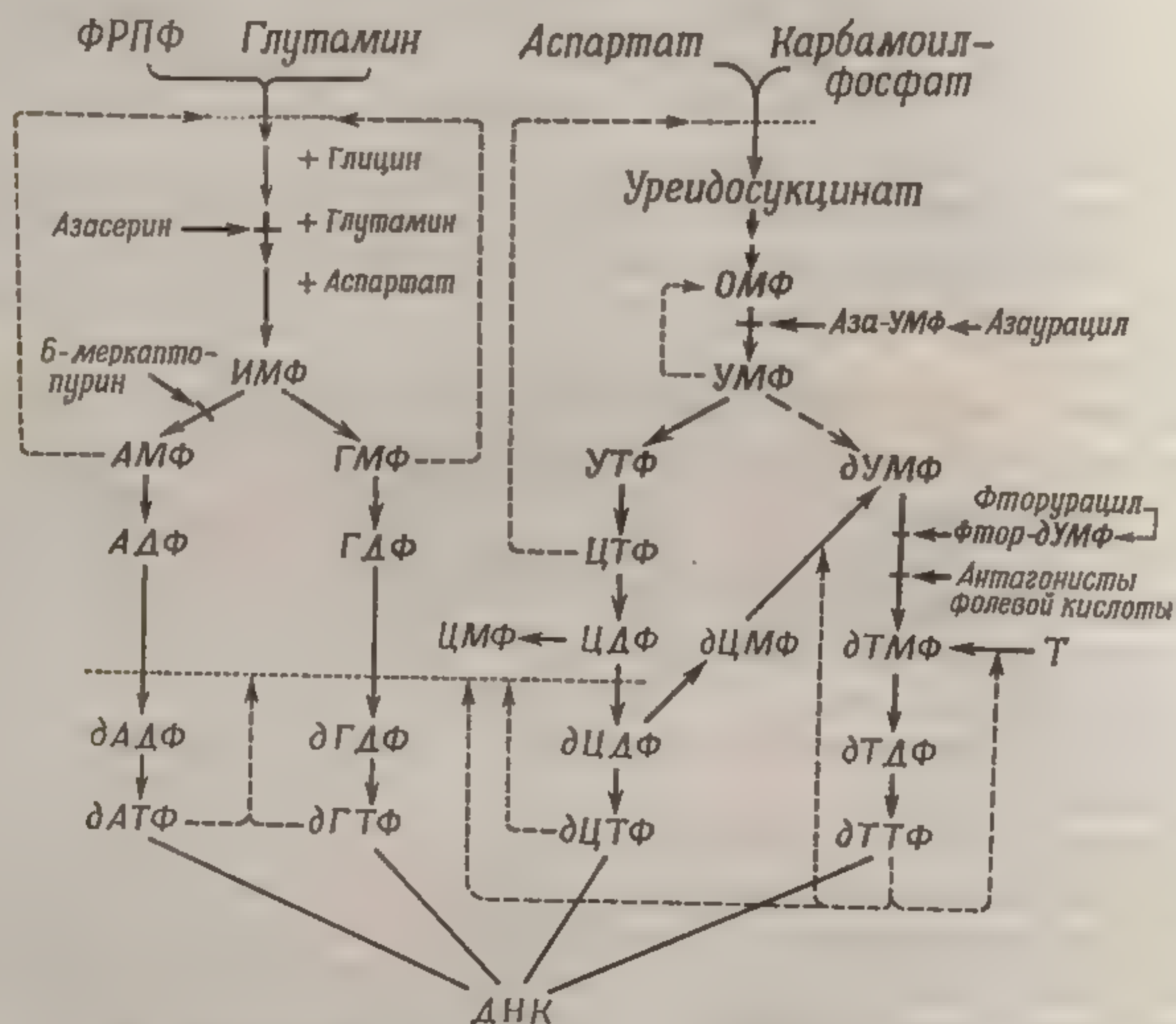
Например, как АМФ, так и ГМФ [116] тормозят активность фосфорибозилпирофосфат-аминотрансферазы (К. Ф., 2.4.2.14) — первого специфического фермента в цепи реакций, осуществляющих биосинтез пурина (стр. 173); они участвуют также в других механизмах регуляции [117]. ЦТФ регулирует биосинтез пиримидина, ингибируя непосредственно аспартат-карбамоилтрансферазу (К. Ф., 2.1.3.2.), первый специфический фермент этого пути (стр. 178), катализирующий конденсацию карбамоилфосфата и аспартата [57, 58] с образованием уреидосукцината (фиг. 61). В регенерирующей печени крысы активность аспартаткарбамоилтрансферазы начинает возрастать сразу после гепатэктомии, достигает максимума через 49 час и возвращается к нормальному уровню, когда восстанавливается исходный размер печени [114]. Вполне возможно, что скорость роста печени отчасти регулируется концентрацией пиримидиннуклеотидов, образующихся при действии фермента [114]. Усиление активности этого фермента наблюдается в случае гепатомы Новикова [157].

УМФ подавляет активность оротидинмонофосфатдекарбоксилазы также по принципу обратной связи (стр. 179).

Количество фермента, образующегося в формирующей его системе, возможно, также регулируется с помощью отрицательной обратной связи. Например, производные пиримидина подавляют у *E. coli* образование трех ферментов: аспартаткарбамоилтрансферазы (К. Ф., 2.1.3.2.), дигидрооротазы и дигидрооротатдегидрогеназы [57].

Иной контролирующий механизм регулирует превращение производных рибозы в производные дезоксирибозы (стр. 179), протекающее на уровне нуклеозиддифосфатов и не затрагивающее гликозидную связь между сахарным компонентом и основанием

[76, 77]. Превращение ЦМФ в дЦМФ, или вернее ЦДФ в дЦДФ, приводящее в конце концов к биосинтезу ДНК, ингибируется очень низкими концентрациями ($5 \cdot 10^{-5}$ M) дезоксаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ) и в меньшей степени тимидинтрифосфата (дТТФ). Этот эффект наблюдался в экстрактах из зародышей цыплят [119]; действие ТТФ также может быть продемонстрировано на культуре клеток млекопитающих [120].



Фиг. 61. Пути биосинтеза дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Механизмы обратной связи изображены пунктиром. Показано, на каких этапах проявляется блокирующее действие антиметаболитов.

Подобный же эффект подавления дезоксаденозинтрифосфатом процесса восстановления гуанозиннуклеотида в дезоксигуанозиннуклеотид, был получен с асцитными клетками Эрлиха [121]. Скорее всего именно так можно объяснить тот факт, что и в асцитных клетках Эрлиха [122] и в зародышах цыплят [123] синтез ДНК ингибируется дезоксаденозином, который легко превращается в трифосфат.

Создается впечатление, что синтез ДНК с большей легкостью протекает при критических концентрациях дезоксирибонуклеозидтрифосфатов [119] и что эти соединения являются компонентами гомеостатического механизма (фиг. 61).

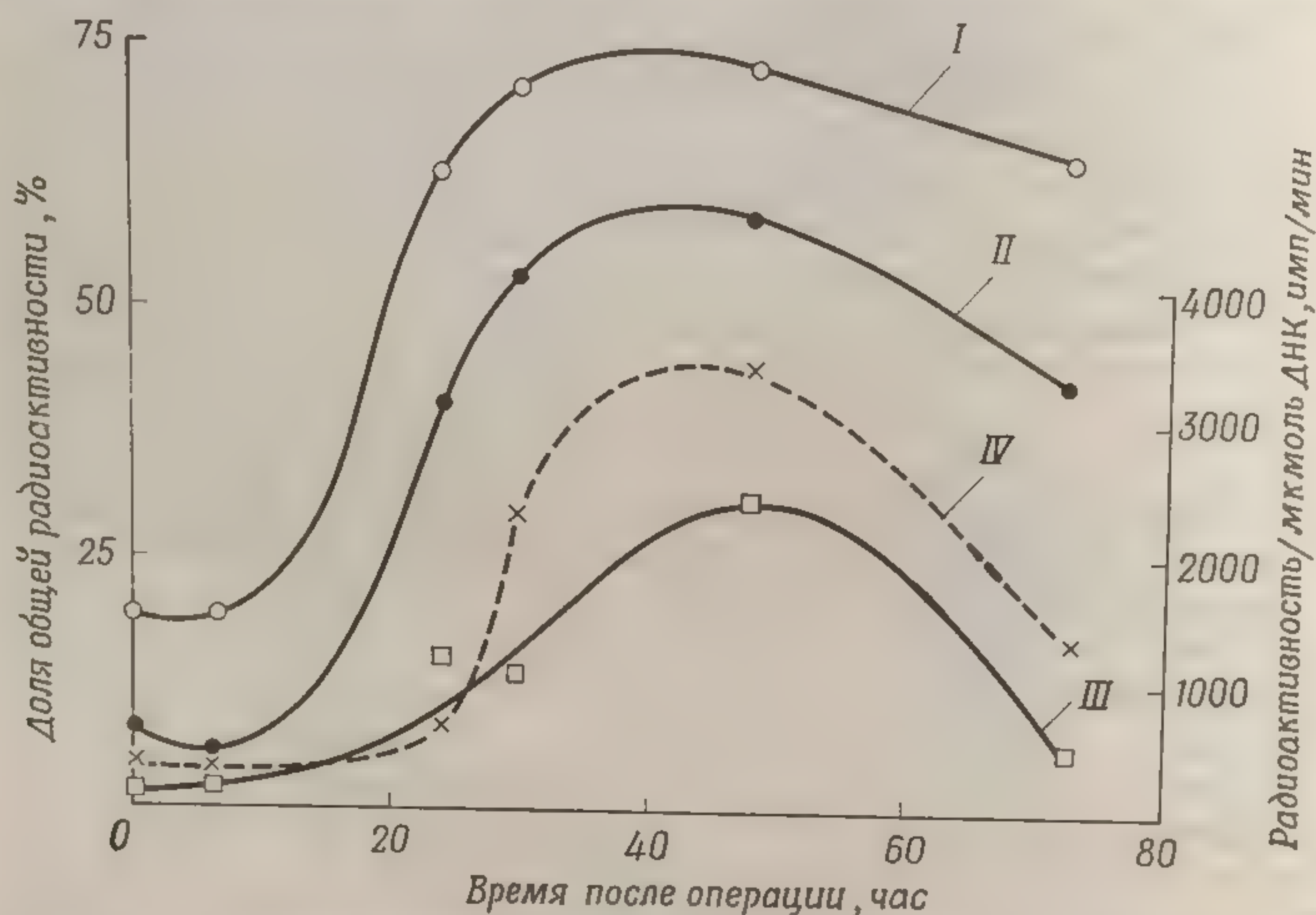
Третий регулирующий механизм включается при образовании дезоксиуридинмонофосфата, являющегося прямым предшественником тимидинового ряда нуклеотидов. Дезоксиуридинмонофосфат (дУМФ) образуется непосредственно из уридинмонофосфата (УМФ), о чем говорят результаты опытов, проведенных на *Salmonella typhimurium* [124] и на зародышах цыплят [125]. Однако во многих тканях [126, 127] УМФ превращается в дУМФ иным путем, через цитидиннуклеотиды (фиг. 61), причем аминирование уридинпроизводных в цитидинпроизводные протекает, вероятно, на уровне рибонуклеозидтрифосфатов [153, 154]. Затем дЦМФ превращается в дУМФ с помощью фермента дезоксицитидилатдезаминазы. Фермент этот обладает очень низкой активностью во многих «зрелых» тканях млекопитающих, за исключением зубной железы и костного мозга [127], энергично синтезирующих ДНК. Вместе с тем этот фермент очень активен в быстро растущих тканях, например у зародышей цыплят и крыс или в регенерирующей печени взрослых крыс [128—130, 155]; возможно, он участвует в одном из звеньев, регулирующих скорость биосинтеза ДНК [128, 132]. В некоторых опухолях, например в гепатоме Новикова, активность дезоксицитидилатдезаминазы выражена очень сильно, в других же (в гепатоме Морриса 5123 и в гепатоме Данинга L-C18) этого не наблюдается [133]; важность этих данных обсуждалась Поттером и его сотрудниками [114, 158] в связи с гипотезой, основанной на выпадении нуклеотидов из молекулы ДНК.

Активность дезоксицитидилатдезаминазы в нормальной печени крысы незначительна [134]. Она заметно возрастает при регенерации печени примерно через 12 час после частичной гепатэктомии, достигает максимума приблизительно через 48 час и затем снижается. Повышение активности этого фермента опережает повышение активности других ферментов, связанных с образованием тимидинмонофосфата (дТМФ) и фосфорилированием. Этот факт согласуется с последовательной индукцией ферментов, участвующих в биосинтезе ДНК [129]. Первым из этих ферментов является тимидилатсинтетаза, которая превращает дУМФ в дТМФ; ее активность возрастает в регенерирующей печени сразу вслед за активностью дезоксицитидилатдезаминазой. Было высказано предположение [129], что дУМФ может активировать или индуцировать образование тимидилатсинтетазы, которая в свою очередь при участии образовавшегося ТМФ может индуцировать ТМФ-киназу. На этой киназе и близких ей ферментах мы сейчас и остановимся.

Киназы, фосфорилирующие тимидиннуклеотиды до дТТФ, активны в таких тканях, как зубная железа и костный мозг, т. е. там, где четко выражен синтез ДНК, и мало активны в таких тканях, как печень, где не происходит размножения клеток. В печени, регенерирующей после частичной гепатэктомии, актив-

ность киназы высока, особенно через 48 час после операции [106, 135—140]. В этом отношении дТМФ-киназная система отличается от киназ, участвующих в фосфорилировании дАМФ, дГМФ и дЦМФ, активность которых в нормальной и регенерирующей печени примерно одинакова [106, 136].

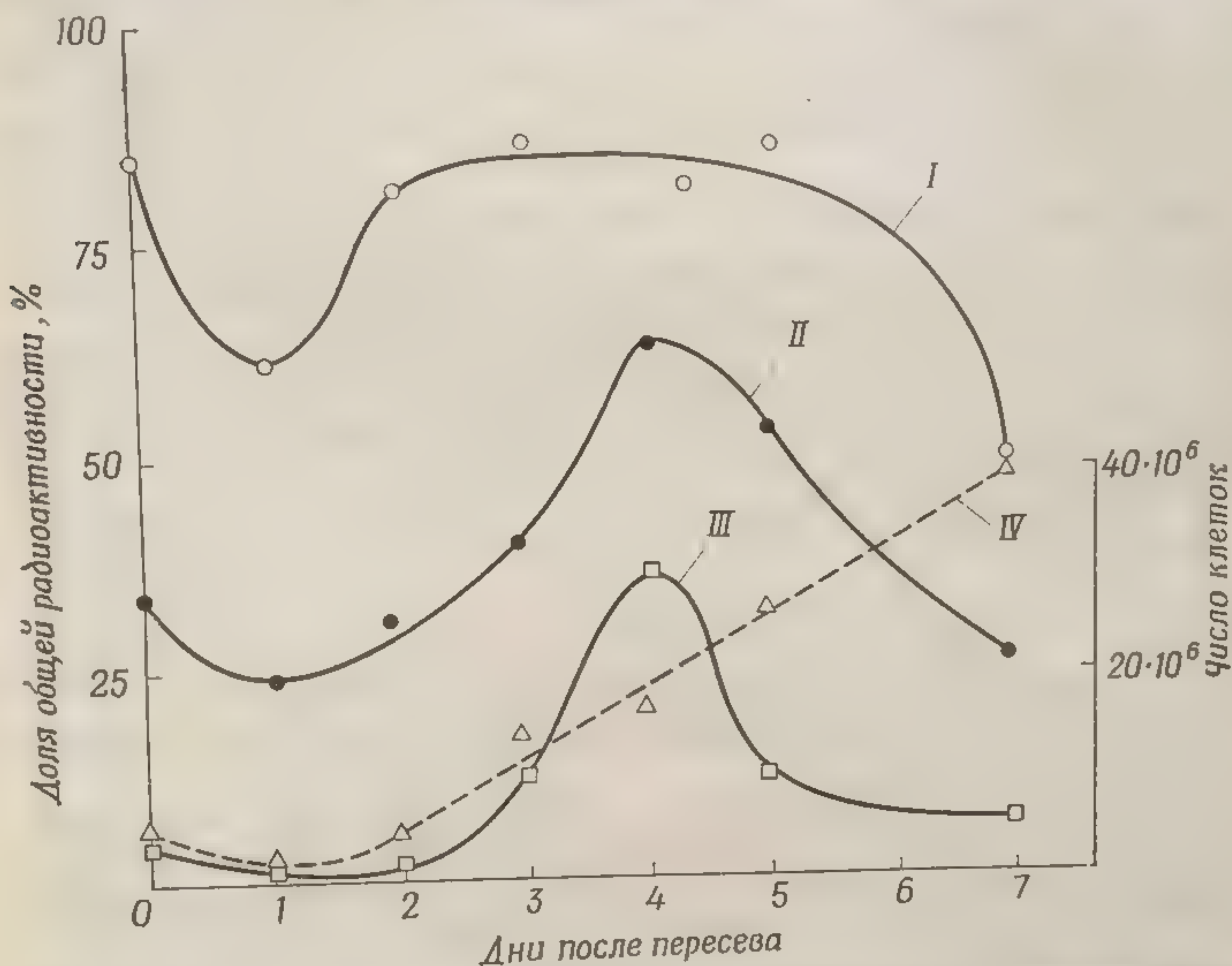
Одна из наиболее важных киназ — тимидинкиназа, фосфорилирующая тимидин до дТМФ; по многим признакам она является



Фиг. 62. Фосфорилирование H^3 -тимидина и его включение в ДНК [106]. Опыт проведен с экстрактами из регенерирующей печени крысы через различное время после частичной гепатомэктомии. Приведенные результаты отражают активность дТДФ, дТМФ и Т-киназ, определяемую по доле радиоактивности (имп/мин), обнаруженной в дТТФ, дТДФ + дТТФ и дТМФ + дТДФ + дТТФ соответственно. I — дТМФ + дТДФ + дТТФ; II — дТДФ + дТТФ; III — дТТФ; IV — удельная радиоактивность ДНК.

тем ферментом, который определяет скорость биосинтеза ДНК. Ее активность очень усиливается в регенерирующей печени крысы [106, 136, 137, 140], в печени крыс, находящихся на белковой диете [142], и в других активно пролиферирующих тканях [106, 135, 137]. Она возрастает в культуре клеток после заражения ДНК-содержащими вирусами [141, 143, 144]; эти вирусы даже могут вызвать появление тимидинкиназы в мутантах фибробластов, в которых до заражения фермент этот не обнаруживается [118]. Тимидинкиназа ингибируется дТТФ [131, 145—150] и ЦТФ [148,

149]. Следовательно, дТТФ по принципу обратной связи подавляет, во-первых, тимидинкиназу, не действуя при этом на дТМФ-киназу [146], а во-вторых, тормозит превращение ЦДФ в дЦДФ [119, 120], а также дезаминирование дЦМФ [132, 145, 151, 152]



Фиг. 63. Фосфорилирование ^3H -тимидина гомогенатом из L-клона фибробластов мышей после пересева на свежую среду [106]. Приведенные результаты отражают активность дТДФ, дТМФ и Т-киназы, определяемую по доле радиоактивности (имп/мин), обнаруженной в дТТФ, дТДФ + дТТФ и дТМФ + дТДФ + дТТФ соответственно.
I — дТМФ + дТДФ + дТТФ; II — дТДФ + дТТФ; III — дТТФ; IV — число клеток.

(фиг. 61). Таким образом, этот механизм препятствует накоплению больших количеств дТТФ как из дезокситимидина, так и из ЦДФ через дУМФ.

При изучении динамики киназ в регенерирующей печени крысы после частичной гепатэктомии было показано [106], что ферменты, по-видимому, появляются в определенной последовательности (фиг. 62). К 24 час начинает резко увеличиваться активность тимидинкиназы, достигая максимума через 30 час после операции. Вслед за ней возрастает активность дТМФ-киназы; максимум суммарного включения ^3H -тимидина приходится примерно на

48 час. Затем активность всех киназ снижается. Такая же тенденция последовательного появления киназ была обнаружена в культуре L-клона фибробластов мыши [106]. В фазе покоя, наступающей при истощении культуральной среды, эти клетки либо не проявляют никакой киназной активности, либо проявляют только тимидинкиназную активность. При переносе на новую среду после некоторой лаг-фазы наступает период быстрого роста (фиг. 63). Активность тимидинкиназы появляется сразу, резко возрастает и остается высокой. Активность ТМФ-киназы усиливается позже, достигает максимума в начальной стадии роста клеток и снижается, прежде чем рост (увеличение числа клеток) прекратится. Это соотношение ферментов можно в сильной степени изменить, добавляя в среду тимидин; при этом скорость роста не меняется. В течение начального этапа роста активность ферментов почти такая же. Во время быстрого роста числа клеток активность тимидинкиназы остается высокой на гораздо больший срок, а у дТМФ-киназы наблюдается второй максимум активности, в то время как в контроле отмечается спад. Такие подъемы киназной активности могут быть получены только в период роста и, очевидно, обусловлены действительной индукцией ферментов, хотя следует принимать во внимание, что дТМФ-киназа — очень лабильный фермент, стабилизирующийся в присутствии тимидина или тимидилата [156].

В обычной печени нет киназ, фосфорилирующих тиминные нуклеотиды. Однако там имеются ферменты, осуществляющие восстановительный катаболизм тимина. В гепатомах, например. Новикова и Даннинга катаболические ферменты отсутствуют [133] и производные тимина могут, следовательно, по анаболическому пути превращаться в дТТФ. Отсутствие ферментов катаболизма в активно пролиферирующих клетках, активно синтезирующих ДНК, очень важно для гипотезы, основанной на выпадении нуклеотидов из молекулы ДНК [114].

ЛИТЕРАТУРА

1. Sonne J. C., Buchanan J. M., Delluva A. M., J. Biol. Chem., 173, 69 (1948).
2. Buchanan J. M., Sonne J. C., Delluva A. M., J. Biol. Chem., 173, 81 (1948).
3. Shemin D., Rittenberg D., J. Biol. Chem., 167, 875 (1947).
4. Abrams R., Hammarsten E., Shemin D., J. Biol. Chem., 173, 429 (1948).
5. Heinrich M. R., Wilson D. W., J. Biol. Chem., 186, 447 (1950).
6. Buchanan J. M. et al., Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Purines, p. 233, London, Churchill (1957).
7. Edson N. L., Krebs H. A., Model A., Biochem. J., 30, 1380 (1936).

8. Greenberg G. R., Arch. Biochem., 19, 337 (1948).
9. Schulman M. P., Sonne J. C., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 196, 499 (1952).
10. Sonne J. C., Lin I., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 220, 359 (1956).
11. Levenberg B., Hartman S. C., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 220, 370 (1956).
12. Greenberg G. R., Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Purines, p. 204, London, Churchill (1957).
13. Hartman S. C., Buchanan J. M., Ann. Rev. Biochem., 28, 365 (1959).
14. Buchanan J. M., Hartman S. C., Advances in Enzymology, 21, 199 (1959).
15. Reichard P., The Nucleic Acids, Vol. 2, p. 277 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1955). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1957, стр. 223.)
16. Greenberg G. R., J. Biol. Chem., 190, 611 (1951).
17. Stretton M. R., Fox C. L., Jr., J. Biol. Chem., 161, 333 (1945).
18. Schulman M. P., Buchanan J. M., Fed. Proc., 10, 244 (1951).
19. Schulman M. P., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 196, 513 (1952).
20. Buchanan J. M., Schulman M. P., J. Biol. Chem., 202, 241 (1953).
21. Greenberg G. R., Fed. Proc., 12, 211 (1953).
22. Greenberg G. R., J. Biol. Chem., 219, 423 (1956).
23. Goldthwait D. A., Peabody R. A., Greenberg G. R., J. Amer. Chem. Soc., 76, 5258 (1954).
24. Hartman S. C., Levenberg B., Buchanan J. M., J. Amer. Chem. Soc., 77, 501 (1955).
25. Kornberg A., Lieberman I., Simms E. S., J. Amer. Chem. Soc., 76, 2027 (1954).
26. Kornberg A., Lieberman I., Simms E. S., J. Biol. Chem., 215, 389 (1955); *ibid.*, 215, 417 (1955); Remy C. N., Remy W. T., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 217, 885 (1955).
27. Goldthwait D. A., Greenberg G. R., Peabody R. A., Biochim. Biophys. Acta, 18, 148 (1955).
28. Goldthwait D. A., J. Biol. Chem., 222, 1051 (1956).
29. Hartman S. C., Fed. Proc., 15, 269 (1956).
30. Schlenk F., The Nucleic Acids, Vol. 2, p. 309 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1955). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1957, стр. 250.)
31. Levenberg B., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 224, 1019 (1957).
32. Melnick I., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 225, 157 (1957).
33. Goldthwait D. A., J. Biol. Chem., 222, 1051 (1956).
34. Hartman S. C., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 234, 1812 (1959).
35. Levenberg B., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 224, 1005 (1957).
36. Lukens L. N., Buchanan J. M., Fed. Proc., 15, 305 (1956).
37. Levenberg B., Melnick I., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., 225, 163 (1957).
38. Carter C. E., Cohen L. H., J. Biol. Chem., 222, 17 (1956).
39. Abrams R., Bentley M., J. Amer. Chem. Soc., 77, 4179 (1955).
40. Lieberman I., Fed. Proc., 15, A982 (1956); J. Amer. Chem. Soc., 78, 251 (1956).

41. Lieberman I., J. Biol. Chem., 223, 327 (1956).
42. Skipper H. E., Mitchell J. H., Bennett L. L., Cancer Res., 10, 510 (1950).
43. Skipper H. E., Bennett L. L., Law L. W., Cancer Res., 12, 677 (1952).
44. Rhoads C. P. (Ed.), Anti-metabolites and Cancer (American Association for the Advancement of Science) (1955).
45. Kalckar H., Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 38 (1947).
46. Brawerman G., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 15, 549 (1954).
47. Reichard P., Advances in Enzymology, 21, 263 (1959).
48. Crosbie G. W., The Nucleic Acids, Vol. 3, p. 323 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1960). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1962, стр. 270.)
49. Lieberman I., Kornberg A., J. Biol. Chem., 207, 911 (1954).
50. Cooper C., Wu R., Wilson D. W., J. Biol. Chem., 216, 37 (1955).
51. Wu R., Wilson D. W., J. Biol. Chem., 223, 195 (1956).
52. Jones M. E., Spector L., Lipman F., J. Amer. Chem. Soc., 77, 819 (1955).
53. Schulman M. P., Badger S. J., Fed. Proc., 13, 292 (1954).
54. Smith L. H., Stetten D., J. Amer. Chem. Soc., 76, 3864 (1954).
55. Heinrich M. R., Dewey V. C., Kidder G. W., J. Amer. Chem. Soc., 76, 3102 (1954).
56. Kornberg A., Lieberman I., Simms E. S., J. Biol. Chem., 215, 389 (1955).
57. Changeux J. P., Sci. Amer. (April), p. 36 (1965).
58. Gerhart J. C., Pardee A. B., Fed. Proc., 23, 727 (1964).
59. Mokrasch L. C., Grisolia S., Biochim. Biophys. Acta, 27, 226 (1958).
60. Lieberman I., J. Amer. Chem. Soc., 77, 2661 (1955).
61. Lieberman I., J. Biol. Chem., 222, 765 (1956).
62. Totter J., J. Amer. Chem. Soc., 76, 2196 (1954).
63. Elwyn D., Sprinson D. B., J. Biol. Chem., 207, 467 (1954).
64. Crosbie G. W., Biochem. J., 69, 1P (1958).
65. Goldthwait D., Bendich A., J. Biol. Chem., 196, 841 (1952).
66. Friedkin M., Roberts D., Fed. Proc., 14, 215 (1955).
67. Prusoff W. H., Lajtha L. G., Welch A. D., Biochim. Biophys. Acta, 20, 209 (1956).
68. Rose I. A., Schweigert B. S., J. Biol. Chem., 202, 635 (1953).
69. Kornberg A., The Chemical Basis of Heredity (W. D. McElroy and B. Glass, Eds.), Baltimore, Johns Hopkins Press (1957). (Химические основы наследственности, М., ИЛ, 1960, стр. 468.)
70. Blakely R. L., Biochim. Biophys. Acta, 24, 224 (1957).
71. Phear E. A., Greenberg D. M., J. Amer. Chem. Soc., 79, 3737 (1957).
72. Cohen S. S., Green M., Barnes H. D., Biochim. Biophys. Acta, 22, 210 (1956).
73. Flaks J. G., Lukens L. N., Methods in Enzymology, Vol. 6, p. 52 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1963).
74. Warren L., Metabolic Pathways, Vol. 2, p. 459 (D. M. Greenberg, Ed.), New York, Academic Press, (1961).
75. Schulman M. P., Metabolic Pathways, Vol. 2, p. 389 (D. M. Greenberg, Ed.), New York, Academic Press (1961).
76. Reichard P., Biochim. Biophys. Acta, 41, 368 (1960).

77. R e
(19
78. R e
79. M o
80. R e
81. R o
J.
82. B r
Int
Pro
83. M c
84. M c
85. R e
86. E d
87. R e
88. F l
89. G r
65
90. G r
91. M o
92. K a
93. F r i
220
94. F r i
95. M c
Cel
96. L u
97. T a
Sci
98. P a
328
99. F i
100. G a
101. B o
102. M a
628
103. D a
I e
104. S m
Bi
105. S m
B
(19
106. W e
Bi
107. G r
108. G r
109. D a
110. D a
of
111. L a
re
112. P o
113. P o
114. P o
of

77. Reichard P., Rutberg L., *Biochim. Biophys. Acta*, 37, 554 (1960).
78. Reichard P., *J. Biol. Chem.*, 237, 3513 (1962).
79. Moore E. C., Reichard P., *J. Biol. Chem.*, 238, PC2244 (1963).
80. Reichard P., *J. Biol. Chem.*, 239, 3436, 3445 and 3453 (1965).
81. Roll P. M., Weinfeld H., Carroll E., Brown G. B., *J. Biol. Chem.*, 220, 439.
82. Brown G. B., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 60, Art. 2, 185 (1954); *Proc. Internat. Conf. Peaceful Uses of Atomic Energy*, 12, 485 (1955); *Fed. Proc.*, 15, 823 (1956).
83. McNutt W. S., *J. Biol. Chem.*, 233, 189 (1958).
84. McNutt W. S., *J. Biol. Chem.*, 233, 193 (1958).
85. Reichard P., *J. Biol. Chem.*, 234, 1244 (1959).
86. Edmonds M., *Fed. Proc.*, 17, 215 (1958).
87. Reichard P., Estborn B., *J. Biol. Chem.*, 188, 839 (1951).
88. Flaks J. G., Cohen S. S., *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 667 (1957).
89. Grossman L., Hawkins G. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 26, 657 (1957).
90. Grossman L., *Fed. Proc.*, 17, 235 (1958).
91. Moyed H. S., Magasanik B., *J. Biol. Chem.*, 226, 351 (1957).
92. Kammen H. O., Hurlbert R. B., *Can. Res.*, 19, 654 (1959).
93. Friedkin M., Tilson D., de Roberts W., *J. Biol. Chem.*, 220, 627 (1956).
94. Friedkin M., Wood H., *J. Biol. Chem.*, 220, 639 (1956).
95. McQuade H. A., Friedkin M., Atchison A. A., *Exp. Cell Res.*, 11, 249 (1956).
96. Lu K. H., Winnick T., *Exp. Cell Res.*, 7, 238 (1954).
97. Taylor J. H., Woods P. S., Hughes W. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 43, 122 (1957).
98. Painter R. B., Forro F., Jr., Hughes W. L., *Nature*, 181, 328 (1958).
99. Firket H., Verly W. G., *Nature*, 181, 274 (1958).
100. Gall J. G., *Biol. Bull.*, 113, 322 (1957).
101. Bollum F. J., Potter V. R., *J. Biol. Chem.*, 233, 478 (1958).
102. Mantsavinos R., Canellakis E. S., *J. Biol. Chem.*, 234, 628 (1959).
103. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Keir H. M., McArdle A. H., *Nature*, 182, 589 (1958).
104. Smellie R. M. S., Keir H. M., Davidson J. N., *Biochim. Biophys. Acta*, 35, 389 (1959).
105. Smellie R. M. S., Gray E. D., Keir H. M., Richards J., Bell D., Davidson J. N., *Biochim. Biophys. Acta*, 37, 243 (1960).
106. Weissman S. M., Smellie R. M. S., Paul J., *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 101 (1960).
107. Grav H. J., Smellie R. M. S., *Biochem. J.*, 89, 486 (1963).
108. Grav H. J., Smellie R. M. S., *Biochem. J.* (1964).
109. Davidson J. N., *Scottish Med. J.*, 8, 87 (1963).
110. Davidson J. N., *The Molecular Basis of Neoplasia*, p. 420, University of Texas Press (1962).
111. Lark K. G., *Molecular Genetics, Part I*, 153 (1963). (Молекулярная генетика, М., «Мир», 1964, стр. 168.)
112. Potter V. R., *Fed. Proc.*, 17, 691 (1958).
113. Potter V. R., *Univ. Michigan Med. Bull.*, 23, 401 (1957).
114. Potter V. R., *The Molecular Basis of Neoplasia*, p. 367, University of Texas Press (1962).

115. Knox W. E., Auerbach V. H., Lin E. C. C., *Physiol. Rev.*, 36, 164 (1956).
116. Wyngaarden J. B., Ashton D. M., *Nature*, 183, 747 (1959).
117. Magasanik B., *The Regulation of Cell Metabolism*, p. 305 (G. E. W. Wolstenholme and C. M. O'Connor, Eds.), London, Churchill (1959).
118. Dubbs D. R., Kit S., *Virology*, 22, 493 (1964).
119. Reichard P., Canellakis Z. N., Canellakis E. S., *Biochim. Biophys. Acta*, 41, 558 (1960).
120. Morris N. R., Fischer G. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 183 (1960).
121. Munch-Petersen A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 3, 392 (1960).
122. Klenow H., *Biochim. Biophys. Acta*, 35, 412 (1959).
123. Maley G. F., Maley F., *J. Biol. Chem.*, 235, 2964 (1960).
124. Grossman L., Hawkins G. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 26, 657 (1957).
125. Reichard P., *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 434 (1958).
126. Hecht L. I., Potter V. R., *Cancer Res.*, 16, 999 (1956).
127. Potter V. R., Pitot H. C., McEly A. B., Morse P. A., *Fed. Proc.*, 19, 312 (1960).
128. Maley G. F., Maley F., *J. Biol. Chem.*, 324, 2975 (1959).
129. Maley F., Maley G. F., *J. Biol. Chem.*, 235, 2968 (1960).
130. Scarano E., Talarico M., Bonaduce L., de Petrocellis B., *Nature*, 186, 237 (1960).
131. Potter V. R., *Metabolic Control Mechanisms in Animal Cells*, National Cancer Institute Monograph, No. 13, p. 111 (1964).
132. Maley F., Maley G. F., *Metabolic Control Mechanisms in Animal Cells*, National Cancer Institute Monograph No. 13, p. 117 (1964).
133. Potter V. R., Pitot H. C., Ono T., Morris H. P., *Cancer Res.*, 20, 1255 (1960).
134. Maley G. F., Maley F., *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 181 (1961).
135. Bollum F. J., Potter V. R., *J. Biol. Chem.*, 233, 478 (1958).
136. Bollum F. J., Potter V. R., *Cancer Res.*, 19, 561 (1959).
137. Mantsavinos R., Canellakis E. S., *J. Biol. Chem.*, 234, 628 (1959).
138. Canellakis E. S., Jaffe J. J., Mantsavinos R., Krakow J. S., *J. Biol. Chem.*, 234, 2096 (1959).
139. Hiatt H. H., Bojarski T. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2, 35 (1960).
140. Weissman S. M., Paul T., Thomson R. Y., Smellie R. M. S., Davidson J. N., *Biochem. J.*, 76, 1P (1960).
141. Kit S., *Viruses, Nucleic Acids and Cancer*, p. 296, Baltimore, Williams and Wilkins (1963).
142. Gebert R. A., Potter V. R., *Fed. Proc.*, 23, 268 (1964).
143. Kit S., Dubbs D. R., Piekarski L. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 8, 72 (1962).
144. McAuslan B. R., Joklik W. K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 8, 486 (1962).
145. Maley F., Maley G. F., *Biochemistry*, 1, 847 (1962).
146. Ives D. H., Morse P. A., Jr., Potter V. R., *J. Biol. Chem.*, 238, 1467 (1963).
147. Breitman T. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 153 (1963).
148. Bresnick E., Karjala R. J., *Cancer Res.* (1964).

149. Bresnick F., Thompson U. B., Morris H. P., Liebelt A. G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 16, 278 (1964).
150. Okazaki R., Kornberg A., J. Biol. Chem., 239, 275 (1964).
151. Maley G. F., Maley F., J. Biol. Chem., 237, PC3311 (1962).
152. Scarano E., Geraci G., Rossi M., Biochem. Biophys. Res. Comm., 16, 239 (1964).
153. Lieberman I., J. Biol. Chem., 222, 765 (1956).
154. Hurlbert R. B., Kammen H. O., J. Biol. Chem., 235, 443 (1960).
155. Maley G. F., Maley F., J. Biol. Chem., 239, 1168 (1964).
156. Bojarski T. B., Hiatt H. H., Nature, 188, 1112 (1960).
157. Calva E., Lowenstein J. M., Cohen P. P., Cancer Res., 19, 101 (1959).
158. Potter V. R., Cancer Research, 24, 1085 (1964).

ГЛАВА XI

РЕПЛИКАЦИЯ И БИОСИНТЕЗ ДНК

Процесс репликации

По современным представлениям, в последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК заключена генетическая информация, или «код». Поэтому понять механизм образования и воспроизведения ДНК в клетке чрезвычайно важно. Не удивительно, что по этой проблеме высказано очень много предположений [1—4]. Все они исходят из следующей гипотезы: ДНК, очевидно, является активной основой гена; следовательно, ее биосинтез должен заключаться в воссоздании точной копии существующей молекулы. В пользу этого предположения говорит то обстоятельство, что ДНК, синтезированная с помощью ферментной системы Кориберга (стр. 207), по нуклеотидному составу идентична ДНК, взятой в качестве затравки. На модели Уотсона и Крика легко себе наглядно представить, каким образом происходит репликация ДНК. Представим себе короткую двойную спираль ДНК с такой последовательностью оснований, которая показана на фиг. 64. Предположим далее, что цепи ДНК раскручиваются и отделяются друг от друга, образуя две отдельные одинарные цепи (фиг. 64, посредине). Теперь допустим, что каждое из оснований одинарной цепи способно присоединять к себе комплементарно новые дезокси-нуклеозидмонофосфаты (либо ди-, либо трифосфаты) при помощи таких же водородных связей, которые существовали в исходной двойной спирали ДНК. И наконец, допустим, что новые мононуклеотиды полимеризуются и образуют полинуклеотидную цепь (фиг. 64, внизу). Тогда мы получим в конечном итоге две полные двухцепочечные спирали ДНК. В каждой молекуле одна цепь берет свое начало от исходной молекулы, а вторая образуется вновь.

Несмотря на привлекательность этой гипотезы, ряд возникших затруднений не позволяет принять ее в такой простой форме. В частности, трудно представить себе, каким образом могут раскрутиться цепи такой длинной спирали, как молекула ДНК, хотя несколько возможных решений этой проблемы кажутся весьма остроумными [5, 6, 150, 151, 163]. Для разделения каждых 10 пар оснований молекуле надо повернуться один раз вокруг своей оси. Тогда для полного разделения цепей молекула должна вращаться

со скор
такое в
такому
трудно
в случа
предпо
нается

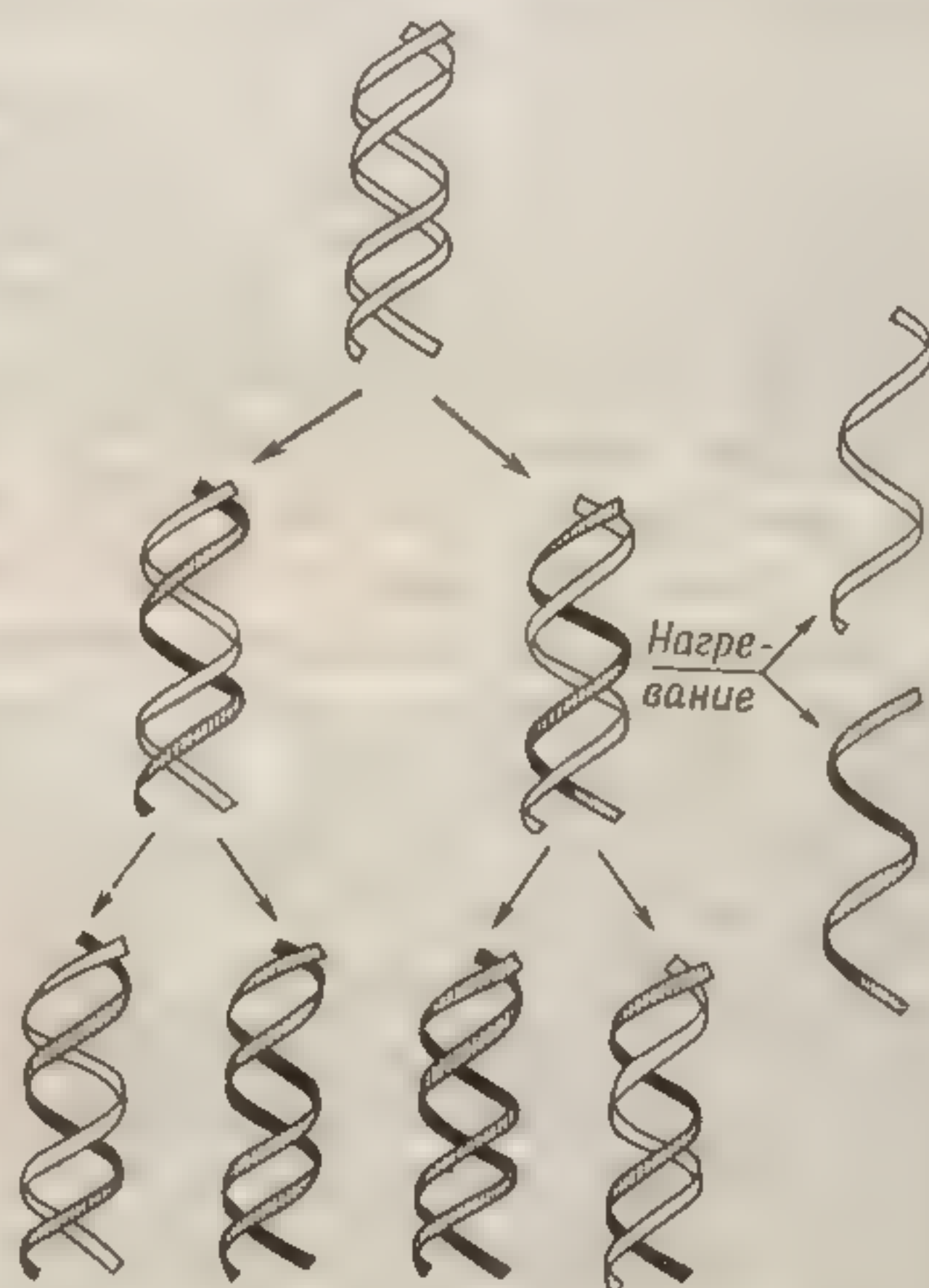
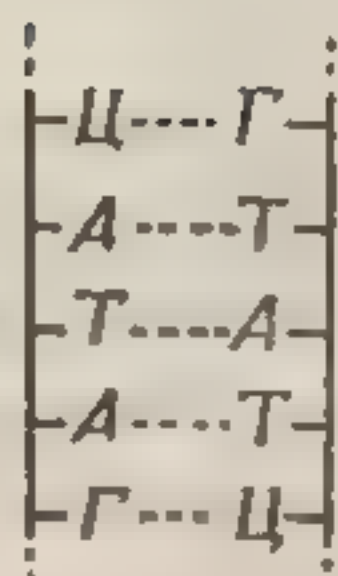
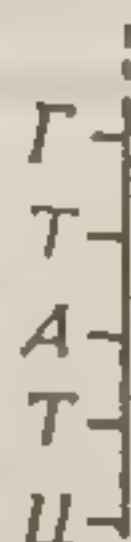
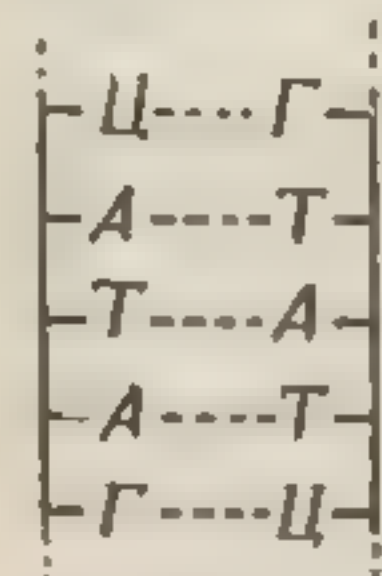
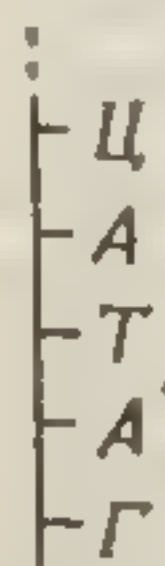
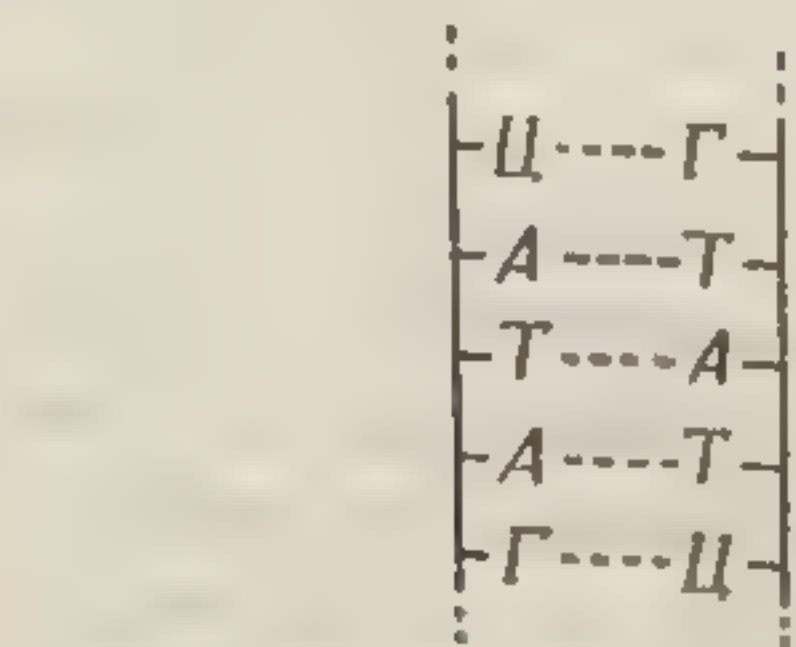
Ц
А
Т
А
Г

Ц
А
Т
А
Г

Фиг. 64.
Цепи ДНК
молекул
новых це

всегда в
ного «ш
в резул
ся. Кро
таких п
Несм
в пользу
показате
с тяжел
на сред
интенс
на сред

со скоростью 10 000 об/мин. Энергетически, как показали расчеты, такое вращение возможно. Однако трудно представить себе, чтобы такому вращению подвергалась молекула длиной 1 мм. Еще труднее понять, как может действовать описанный механизм в случае циклических молекул ДНК. Однако было высказано предположение [7—9], что у циклических молекул удвоение начинается всегда в определенном месте кольца и затем продолжается



Фиг. 64. Схема разделения двух цепей ДНК и образования дочерних молекул ДНК путем образования новых цепей на каждой из родительских.

Фиг. 65. Результаты опыта Мезельсона и Сталя (см. текст). Черные нити соответствуют субъединицам ДНК, меченным N^{15} , белые — субъединицам, несущим N^{14} .

всегда в одном направлении; это достигается с помощью своеобразного «шарнирного» механизма в стартовой (или конечной) точке, в результате чего неудвоенная часть цепи может свободно вращаться. Кроме того, была рассмотрена и квантовомеханическая сторона таких процессов [164, 168].

Несмотря на все эти затруднения, имеются веские доводы в пользу сохранения каждой цепи ДНК при репликации. Наиболее показательны изящные опыты с *E. coli*, выращенной на среде с тяжелым азотом [10]. Четырнадцать поколений выращивали на среде, содержащей 96,5% N^{15} в виде $N^{15}H_4Cl$, что позволило интенсивно «пометить» ДНК по азоту. Затем клетки пересадили на среду, содержащую $N^{14}H_4Cl$, и брали пробы на содержание N^{15}

в ДНК по мере размножения бактерий с интервалом в несколько поколений. Каждую пробу обрабатывали додецилсульфатом натрия и центрифугировали в градиенте плотности CsCl при $140\,000\text{ g}$ в течение 20 час, чтобы дать возможность ДНК достичь седиментационного равновесия. Полосы ДНК были обнаружены в градиенте хлористого цезия при плотности $1,71\text{ г/см}^3$; они хорошо отделились от всех остальных макромолекулярных компонентов бактериального лизата. Положение полос ДНК определялось в ходе центрифугирования по поглощению в ультрафиолете.

В начале опыта ДНК представляла собой одну-единственную полосу, соответствующую нуклеиновой кислоте, интенсивно меченой по азоту. Затем начали появляться макромолекулы с половинным содержанием N^{15} , и в течение одного поколения после пересадки на N^{14} обнаруживались только такие меченные наполовину гибридные молекулы, как $\text{N}^{14} - \text{N}^{15}$. Потом стали находить меченные наполовину ($\text{N}^{14} - \text{N}^{15}$) и немеченные (только N^{14}) молекулы ДНК. После периода времени, соответствующего двум поколениям, меченные наполовину и немеченные молекулы ДНК обнаруживались в равном количестве. В последующих поколениях накапливалась немеченая ДНК. Более того, при нагревании гибридные молекулы $\text{N}^{14} - \text{N}^{15}$ разделялись на две цепи, одна из которых содержала только N^{14} , а другая — N^{15} .

Эти опыты показывают, что во время синтеза ДНК все имеющиеся молекулы разделяются на две субъединицы (фиг. 65), каждая из которых дает начало другой дочерней молекуле. Вторая субъединица каждой дочерней молекулы возникает путем синтеза; эти субъединицы не подвергаются дроблению на части и не изменяются в течение многих поколений.

Результаты описанного опыта, проведенного Мезельсоном и Сталем [10], согласуются с полуконсервативной моделью репликации ДНК, по которой под двумя субъединицами подразумеваются две одинарные цепи спирали ДНК, предполагаемые гипотезой Уотсона и Крика. Эта точка зрения подтверждается экспериментально тем, что связи, удерживающие гибридные субъединицы между собой, разрываются в том же интервале температур, в котором рвутся водородные связи между основаниями в двухцепочечной молекуле ДНК при полном ее «плавлении».

Однако было выдвинуто и иное предположение [11—13]. Возможно, что в быстроделющихся клетках ДНК состоит из четырех цепей и ее репликация происходит консервативным путем. Тогда субъединицы гибридной ДНК — это не одинарные цепи, а двойные спирали, причем отдельные цепи двойных спиралей остаются при «плавлении» соединенными вместе. Чтобы выяснить этот вопрос, была предпринята попытка [14] изучить в щелочной среде процесс «плавления» гибридной ДНК, одна из субъединиц которой

была мечена 5-бромурацилом. Оказалось, что субъединицы скорее всего представляют одинарные цепи, а не двойные спирали.

Опыты на уровне хромосом также говорят в пользу полуконсервативной репликации ДНК. ДНК хромосом *E. coli* метили тритием и затем прослеживали ее репликацию обычными радиоавтографическим путем [7, 8]. Оказалось, что количество трития на единицу длины вновь синтезированной ДНК соответствует наличию всего лишь одной вновь синтезированной цепи в дочерней хромосоме.

Растения в период синтеза ДНК получали в качестве специфического предшественника ДНК меченный тритием тимидин [15]. Во время деления обе дочерние хроматиды оказались мечеными. Однако при следующем цикле удвоения, когда H^3 -тимидин был удален, обе эти хромосомы дали, как и предполагалось, по одной меченой и одной немеченой хроматиде.

Репликон

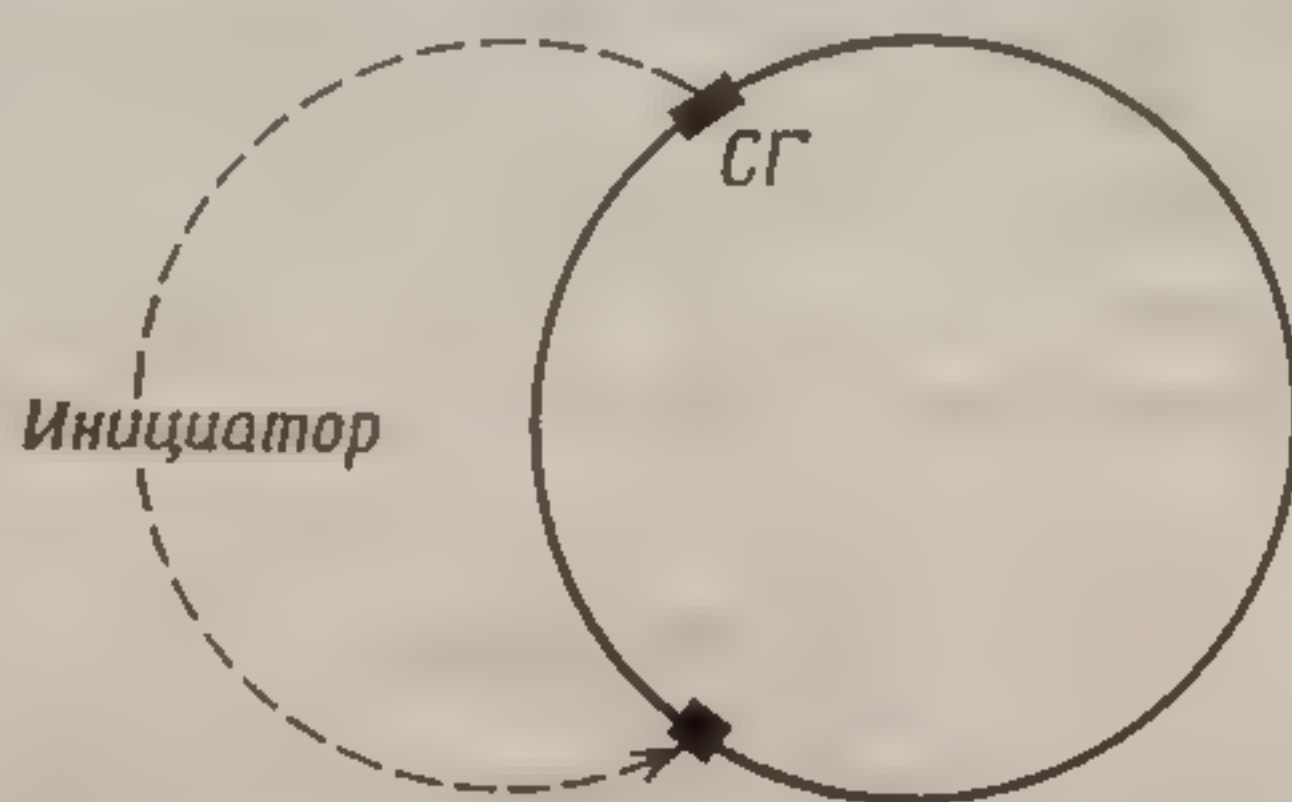
Понятно, что наряду с механизмами, регулирующими наличие предшественников ДНК (гл. X), клетка должна иметь приспособления, специфически регулирующие скорость и ритм процесса репликации. Некоторый прогресс был достигнут при изучении этих явлений на бактериальных системах, на фагах и других бактериальных энзисомах. (Термин *энзисома* употребляется для обозначения необязательных генетических структур, содержащих ДНК, которые могут существовать в бактериальной клетке или как автономная единица, или как компонент, объединенный с бактериальной хромосомой.)

Генетический анализ показал, что у *E. coli* генетическая информация распределена вдоль линейной бактериальной «хромосомы», которая может принимать форму кольца (стр. 72); считают, что репликация начинается с одной определенной точки и происходит постепенно, по мере продвижения вдоль хромосомы. Жакоб и Бреннер [16] считают, что отдельный генетический элемент, например бактериальная хромосома или энзисома, образует единицу репликации, или *репликон*, которая может быть скопирована только целиком. В некоторых отношениях это напоминает *оперон* при транскрипции (284), за исключением того, что, как мы увидим в дальнейшем, он контролируется системой скорее положительной, чем отрицательной регуляции.

Репликон несет две специфические детерминанты: а) *структурный ген* (СГ), контролирующий синтез специфического инициаторного гена, и б) *репликатор*, или *оператор репликации*, на который воздействует инициатор, позволяя тем самым копировать ДНК, прилегающую к репликатору (фиг. 66). Оба эти фактора специфичны

в том смысле, что инициатор, продуцируемый каким-либо одним репликоном, например репликоном фага, «узнает» репликатор именно этого фага, но не репликаторы других фагов или бактериальной хромосомы.

Далее предполагается, что у таких бактерий, как, например, *E. coli*, структурный ген продуцирует инициатор в определенный момент цикла деления. Роль инициатора при этом может выполнять специфическая ДНК-полимераза или иной фермент, участвующий в репликации. Он действует на бактериальный репликатор, копируя расположение его нуклеотидов, и затем осуществляет



Фиг. 66. Схематическое изображение репликона.

репликацию вдоль циклической бактериальной хромосомы до тех пор, пока не будет скопирована вся структура и цикл не завершится [17].

Ферментативный синтез ДНК; фермент Корнберга

В настоящее время мы считаем, что цепи ДНК сохраняются в процессе репликации. В таком случае детальное выяснение механизма образования комплементарных цепей зависит от успехов в изучении тех ферментативных реакций, с помощью которых формируются нити ДНК. Этот вопрос неоднократно рассматривался разными авторами [18—23, 152].

В 1956 г. Корнберг и его сотрудники продемонстрировали синтез ДНК в бесклеточной системе, полученной из клеток *E. coli*, находящихся в экспоненциальной фазе роста. В присутствии АТФ и Mg^{2+} C^{14} -тимидин (специфический предшественник ДНК) включался в кислотонерастворимую фракцию, представляющую собой, по-видимому, ДНК, поскольку после обработки дезоксирибонуклеазой этот осадок уже не осаждался в кислой среде. Используя меченый тимидин и прослеживая его судьбу, дифракционировали экстракт из бактерий и выделили киназную систему, превращавшую тимидин в тимидинтрифосфат (дТТФ). Затем в качестве субстрата стали брать меченый дТТФ и выделили

после многократной (несколько тысяч раз) очистки фермент, осуществляющий включение ТТФ в ДНК [24—27].

В дальнейших экспериментах были использованы этот очищенный ферментный препарат и дТТФ, меченный либо по углероду тимина в положении С-2, либо по фосфору в ближайшей к тимину фосфатной группе. Было показано, что для интенсивного включения дТТФ необходимо было присутствие трифосфатов всех четырех оснований, а также наличие ионов магния и ДНК-затравки. (В первых опытах в качестве затравки использовали ДНК из зубной железы телят.) При этом наблюдалось превосходное включение в ДНК. Ниже приводятся данные о включении P^{32} -дЦТФ в ДНК [25]:

Добавки	P^{32} -ДНК, мкмоль
дЦТФ (без затравки)	0,0
дЦТФ	2,5
дЦТФ + дГТФ	5,1
дЦТФ + дГТФ + дТТФ	15,7
дЦТФ + дГТФ + дТТФ + дАТФ	3300,0

Использованная в этих опытах инкубационная смесь (0,3 мл) содержала 5 мкмоль дЦТФ (ЦФ*ФФ, $7,2 \cdot 10^7$ имп/мин на 1 моль) и по 5 мкмоль остальных дезоксинуклеозидтрифосфатов, а также 1 мкмоль $MgCl_2$, 20 мкмоль глицинового буфера с pH 9,2, 10 мкг ДНК и 3 мкг очищенной «полимеразы» из *E. coli*; инкубацию вели в течение 30 мин при 37° .

Если отсутствовал какой-либо трифосфат, или Mg^{2+} , или ДНК-затравка, то включение было очень слабым. Точно такой же эффект был обнаружен при предварительной обработке затравки дезоксирибонуклеазой. Дифосфаты дезоксирибонуклеозидов не заменяли соответствующих трифосфатов. Использование очищенного ферментного препарата позволило синтезировать такое количество ДНК, что его можно было измерить обычным чисто химическим путем. Увеличение количества ДНК в опыте в 10—20 раз говорило о том, что 90—95% выделенной ДНК возникло за счет добавленных извне дезоксирибонуклеозидфосфатов.

ДНК-полимераза, или дупликаза, иными словами — ДНК-нуклеотидилтрансфераза (К. Ф., 2.7.7.7.), получена теперь в виде чрезвычайно чистого препарата [28, 97] из экстрактов *E. coli*. Этот препарат однороден и не разделяется при седиментации, хроматографии и электрофорезе на крахмальном геле. Очищенные препараты содержат нуклеазы, и только на последних этапах очистки от полимеразы удается отделить так называемую экзонуклеазу III (ДНК-фосфатаза-эксонуклеазу, стр. 95). Даже наиболее чистые препараты еще содержат некоторое количество экзонуклеазы II (стр. 94), причем соотношение между активно-

стями экзонуклеазы II и ДНК-полимеразы в процессе фракционирования не меняется. Пока совершенно непонятна такая тесная связь между этими экзонуклеазами и ДНК-полимеразой; вместе с тем следует отметить, что в очень чистых препаратах ДНК-полимеразы из *Bacillus subtilis* [29] экзонуклеазной активности не обнаружено.

Для изучения ДНК-полимеразы чаще всего используют вытяжки из ряда микроорганизмов, особенно из *E. coli*; однако фермент этот имеется и в тканях млекопитающих. Как и следовало ожидать, ДНК-полимераза наиболее активна в экстрактах из быстро размножающихся клеток, о чем свидетельствуют приведенные ниже данные о включении H^3 -тимидина в ДНК в экстрактах из разрушенных ультразвуком тканей кроликов и цыплят [31].

Ткань	Удельная радиоактивность ДНК на 1 мкмоль фосфора ДНК, имп/мин
Костный мозг кролика	24 750
Зобная железа кролика	9 275
Аппендикс кролика	1 485
Печень кролика	131
Почки кролика	71
Зародыш цыпленка	12 025

В 1 мл использованной в этих опытах реакционной смеси содержалось: 0,1 М фосфатный буфер с pH 8,1, 50 мкмоль глюкозы, 2,5 мкмоль АТФ, 2,5 мкмоль НАД, 4 мкмоль $MgCl_2$, 500 мкг ДНК, 20 мкмоль NaCl и 2 мккюри H^3 -тимидина. Инкубацию проводили в течение 2 час.

Основные исследования по изучению ДНК-полимеразы были выполнены на клетках асцитной опухоли [30—35, 105], на регенерирующей печени крысы [36—38, 102—104], на зобной железе теленка [34, 39—42], на лейкозных клетках мышей [106], на гепатоме Новикова [107] и на L-клетках [145]. ДНК-полимераза, выделенная из животных тканей, не очищена пока в такой степени, как препараты, выделенные из микроорганизмов. ДНК-полимераза очень чувствительна к повышению ионной силы раствора; при концентрации солей, превышающей 0,1 М, ее активность падает примерно в 2 раза [39, 101].

Большое значение имеет природа затравки. Исходя из имеющихся данных, можно думать, что одноцепочечная (денатурированная) ДНК должна быть активнее в качестве затравки, чем двухцепочечная (нативная). И действительно, предположение это подтвердилось при работе с первыми препаратами ДНК-полимеразы из *E. coli*, с ДНК-полимеразами из животных тканей и с полимеразой, индуцированной при заражении *E. coli* бактериофагом T2 (стр. 215). Не удивительно, что прекрасной затравкой

для полимеразы оказалась одноцепочечная ДНК, выделенная из фага ϕ X174.

В опытах с нативной спиральной ДНК в качестве матрицы и очищенным препаратом полимеразы наблюдается образование комплекса, который состоит из матрицы и продукта реакции. Последний можно отделить от матрицы путем денатурации. Полученный продукт напоминает нативную ДНК и отличается от нее лишь в двух отношениях: 1) он обладает необычной способностью восстанавливать после денатурации свою спиральную конформацию («неденатурабельность») и 2) под электронным микроскопом он чаще всего виден в виде разветвленной цепочки [169]. Существует предположение, что при репликации нативной ДНК новые цепи не связаны с матрицей ковалентно, а, возможно, формируется «многошпильчатая» или «складчатая» структура, восстанавливающая свою спиральную форму после денатурации [147]. И действительно, отнюдь не исключено, что фермент Корнберга не обязательно является самым важным участником синтеза ДНК в живой клетке.

Если нативную ДНК обработать экзонуклеазой III, образуется частично одноцепочечная молекула (стр. 95). С помощью полимеразы она может быть реставрирована в нативную двухцепочечную молекулу. Вновь синтезированная ДНК ковалентно связана с 3'-гидроксильным концом деградированной цепи матрицы. Полностью реставрированная ДНК близка к исходной нативной ДНК по форме молекулы (на электронных микрофотографиях), по результатам анализа в градиенте плотности, по способности к денатурации и по генетической активности [148]. Во время синтеза ДНК, идущего вслед за фазой реставрации молекулы, образуется структура, не связанная ковалентно с матрицей; она напоминает продукт, полученный на нативной ДНК в качестве матрицы, по своей разветвленной форме, неденатурабельности и отсутствию генетической активности.

Соблазнительно предположить, что нуклеазы, загрязняющие даже очищенные препараты полимеразы, вызывают частичную деградацию нативной двухцепочечной ДНК, что позволяет использовать ее как затравку в такого рода не полностью очищенных системах. Однако эта мысль не нашла экспериментального подтверждения; во-первых, самая высокоочищенная полимеразы Корнберга из *E. coli* действует одинаково на нативную и на денатурированную ДНК, и, во-вторых, для полимеразы из *B. subtilis*, не содержащей нуклеазы, нативная ДНК служит хорошей затравкой.

Действие полимеразы в присутствии частично деградированной ДНК изучалось преимущественно на ферментных препаратах из животных [34, 40, 42, 43]. Полимеразы из тканей млекопита-

ющих относительно неактивны, если затравкой служит нативная двухцепочечная ДНК. Однако они с готовностью используют одноцепочечную ДНК фага ϕ X174 или полидезоксирибонуклеотид, образованный из нативной ДНК после максимального разрыва водородных связей. Для этой цели нативную ДНК обрабатывают щелочью или кислотой или же нагревают и затем быстро охлаждают, чтобы свести до минимума рекомбинацию разделенных цепей. Обработка ультразвуком сама по себе не дает нужного эффекта, так как вызывает преимущественно разрыв двойной цепи, а не отделение цепей друг от друга. Все это свидетельствует, по-видимому, о том, что основным свойством затравки является наличие одинарной цепи полидезоксирибонуклеотида, которая и выполняет роль матрицы при репликации.

С другой стороны, кратковременное воздействие незначительного количества ДНК-азы I на нативную ДНК [43] приводит к усилению ее затравочной активности (табл. 16). По-видимому,

Таблица 16

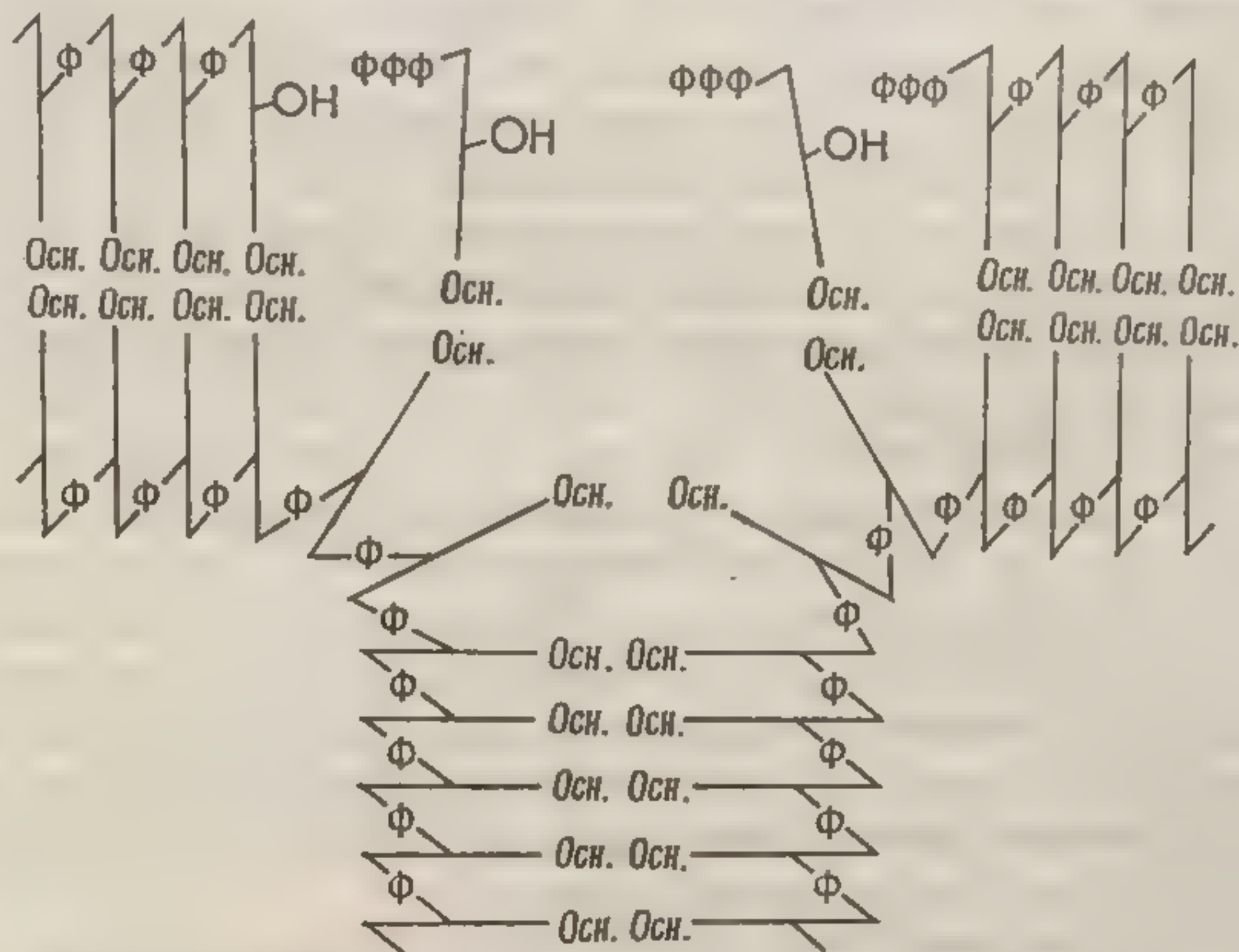
Затравочная активность ДНК при различных воздействиях [43]

Обработка ДНК	Относительная затравочная активность	Преимущественный способ включения нуклеотидов
Контроль (без обработки)	0	—
Кратковременное воздействие ДНК-азы	1	Концевой
Тепловая денатурация	7	Репликативный
Короткое воздействие ДНК-азы с последующей тепловой денатурацией	11	Репликативный

3'-гидроксилконцевые группы в большей степени становятся доступными для нуклеофильной атаки α -фосфатной группы дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. В таком случае следует думать, что деградированная ДНК работает не как матрица, а ее свободные концы используются для насаживания на них новых нуклеотидов (стр. 210). Искусственно синтезированные тимидиновые полимеры, содержащие от трех до семи тимидиловых остатков, также оказались в этом отношении весьма эффективными [42].

Наиболее эффективно модифицируется нативная ДНК при обработке ДНК-азой с последующим нагреванием и быстрым охлаждением. Тем самым формируются не только отделенные друг от друга цепи, действующие как матрицы, но и многочисленные свободные концы молекулы, на которых происходит терминальное (концевое) добавление новых нуклеотидов (табл. 16).

Несмотря на все изложенные соображения, довольно трудно представить себе, каким образом осуществляется репликация в живой клетке. Можно допустить, что при расплетании с конца нативной ДНК образуется раздвоенная, Y-образная структура [42], схематически показанная на фиг. 67. На обеих ветвях этой структуры, т. е. на обеих цепях, отделенных друг от друга, происходит репликация; их можно рассматривать как своеобразные



Фиг. 67. Вероятный механизм формирования новых цепей на каждой цепи Y-образной молекулы ДНК.

«точки роста». Новая цепь ДНК, растущая слева, имеет свободную 3'-гидроксильную группу, к которой может присоединиться извне нуклеозидтрифосфат. Синтезируемая же справа цепь должна, по-видимому, оканчиваться трифосфатной группой, к которой может присоединиться 3'-гидроксильная группа включающегося нуклеотида. Было бы очень интересно выяснить, может ли фермент действовать обоими способами, т. е. присоединять нуклеотиды так, как показано на фиг. 67 слева и справа. Можно даже думать, что ДНК-полимераза способна использовать и нуклеозид-3'-трифосфаты как дополнительные субстраты.

ДНК-полимераза — это фермент, отличающийся необычным свойством: он «руководствуется» указаниями, заложенными в матрице, и честно воспроизводит ее строение. В пользу того, что образующийся продукт действительно является точной копией затравки, говорит ряд экспериментальных данных.

1. Если опыт с ДНК-полимеразой из *E. coli* ставится таким образом, что затравка составляет только 5% всей массы ДНК

в конце эксперимента, то образованная ДНК сходна по своим физическим свойствам с ДНК, выделенной из природного материала. Молекулярный вес обеих ДНК, определенный по коэффициенту седиментации, составляет 4—6 млн. Структура синтезированного продукта, по-видимому, также обусловлена водородными связями; он подвергается «плавлению» (стр. 75) аналогично природной ДНК.

2. Более того, если взять дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, содержащие аналоги оснований, можно синтезировать «уродливые» ДНК [26]. Например, дезоксиинозинтрифосфат (ДИТФ) встает на место дГТФ, но не может заменить дЦТФ, дАТФ или дТТФ. Точно так же 5-бромодезоксиуридинтрифосфат и 5-бромодезоксицитидинтрифосфат могут включаться в синтезируемую ДНК только вместо трифосфатов тимидина и дезоксицитидина соответственно. Закономерность заключается в том, что искусственный аналог включается в ДНК только в случае, если он может образовать водородные связи в спиральной молекуле с партнером того основания, которое он замещает. Интересно, что дезоксиуридинтрифосфат (дУТФ) может замещать дТТФ. Следовательно, отсутствие урацила в природных ДНК, по-видимому, объясняется отсутствием киназы, способной фосфорилировать дезоксиуридин до уровня трифосфатов; вместе с тем широко распространены киназы, фосфорилирующие дезоксирибонуклеозиды (или их монофосфаты) аденина, гуанина, цитозина и тимина.

3. Продукт, образуемый полимеразой, имеет такое же соотношение аденина к тимину и гуанина к цитозину, что и природная ДНК. Кроме того, характерное соотношение А — Т-пар к Г — Ц-парам в затравочной ДНК навязывается синтезируемому продукту вне зависимости от того, составляет ли чистый природный ДНК 1% или 1000%. Соотношение оснований в образовавшемся соединении не нарушается, даже если молярные пропорции субстратов широко варьируют.

4. В образующемся продукте воспроизводится та же последовательность нуклеотидов, что и в ДНК-затравке. Этот факт был установлен в лаборатории Корнберга [18, 20] путем анализа ближайшего соседствования (см. также стр. 231). Частично очищенный препарат полимеразы из *E. coli* инкубируют с затравочной ДНК и всеми четырьмя дезоксирибонуклеозидтрифосфатами, причем один из них, например дАТФ, содержит P^{32} в первом (самом внутреннем) остатке фосфорной кислоты. В процессе синтеза новой ДНК P^{32} образует мостик между нуклеозидом нашего меченого трифосфата (А) и соседним ему нуклеотидом, содержащим неизвестное основание Z и находящимся на растущем конце полинуклеотидной цепи (фиг. 68, А). После завершения синтеза ДНК выделяют и расщепляют ДНК-азой из микрококков (стр. 91)

и диэстеразой из селезенки (стр. 92) до дезоксирибонуклеозид-3'-монофосфатов. В результате такого гидролиза P^{32} остается связанным с С-3'-дезоксирибозы того нуклеотида (в нашем случае Z на фиг. 68), с которым реагировал меченый трифосфат. Z может быть любым из четырех оснований. Все нуклеотиды разделяют с помощью электрофореза на бумаге. Затем измеряют их радиоактивность и тем самым получают данные по относительной частоте, с которой нуклеотид, первоначально меченный в положении 5, располагается возле другого нуклеотида в новой цепи. Эту процедуру повторяют четыре раза, причем каждый раз берут другой меченый дезоксирибонуклеозидтрифосфат. Полученные результаты позволяют представить себе, какие сочетания двух соседних нуклеотидов (динуклеотидов) встречаются чаще всего из всех шестнадцати возможных сочетаний [45]. Данные такого опыта, проведенного с ДНК из *Mycobacterium phlei*, приведены в табл. 17.

Таблица 17

Частота ближайших соседей в ДНК из
Mycobacterium phlei [45]

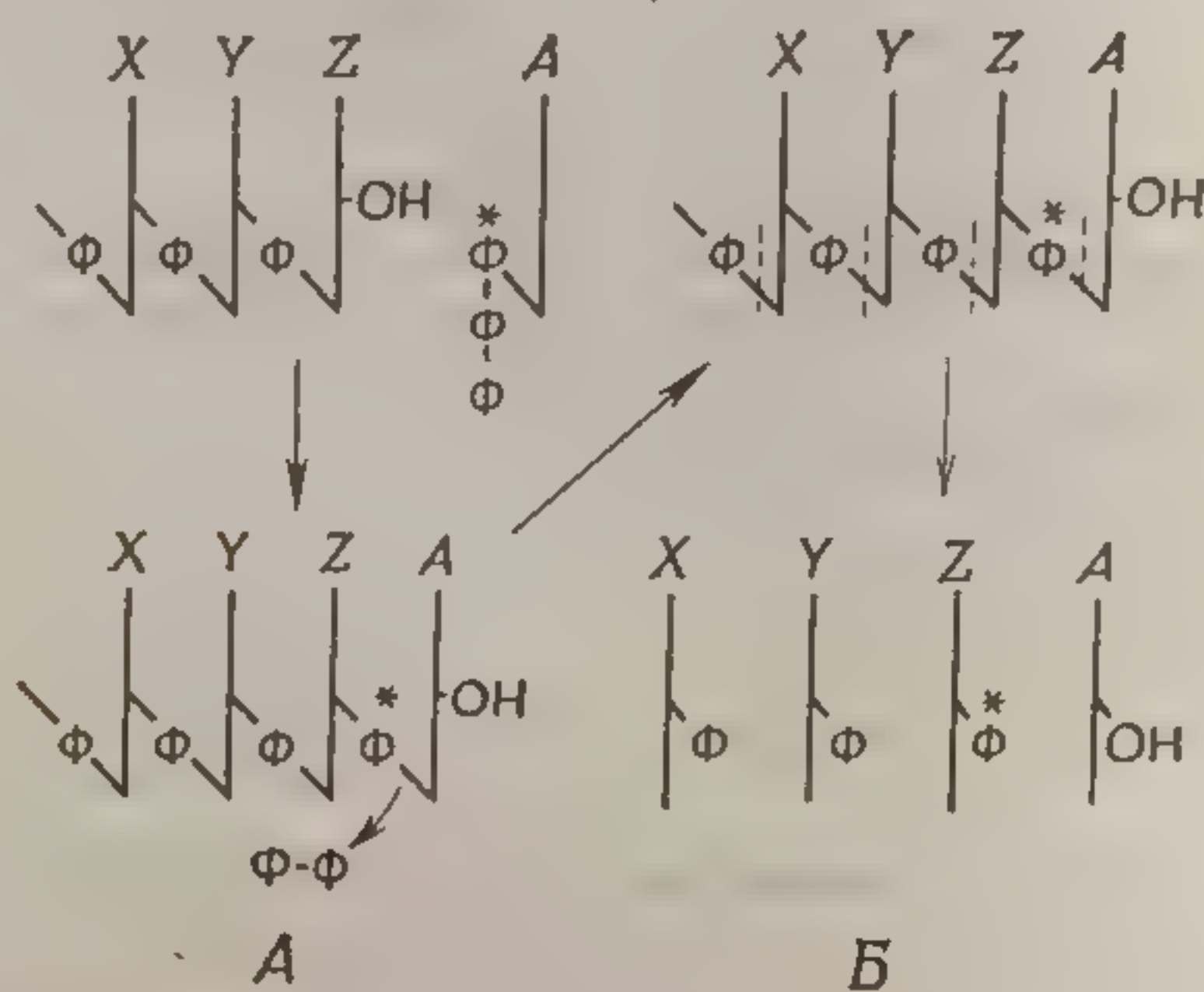
Меченые трифосфаты	Выделенные дезоксирибонуклеозид-3'-фосфаты			
	Тф	Аф	Цф	Гф
ДАТФ	ТфА 0,012	АфА 0,024	ЦфА 0,063	ГфА 0,065
ТТФ	ТфТ 0,026	АфТ 0,031	ЦфТ 0,045	ГфТ 0,060
дГТФ	ТфГ 0,063	АфГ 0,045	ЦфГ 0,139	ГфГ 0,090
дЦТФ	ТфЦ 0,061	АфЦ 0,064	ЦфЦ 0,090	ГфЦ 0,122
В сумме	0,126	0,164	0,337	0,337

Приведенные данные позволяют сказать следующее:

а. Получены все теоретически возможные шестнадцать ближайших пар, причем частота их сильно варьирует.

б. Полученная частота ближайших соседей значительно отличается от той частоты, которой следовало бы ожидать, если бы расположение нуклеотидов было совершенно случайным. Например, при случайном распределении нуклеотидов частота АфТ и ТфА должна была бы быть одинаковой. В действительности же частота АфТ (во втором ряду таблицы) гораздо выше, чем частота ТфА (первый ряд). Следовательно, расположение нуклеотидов подчиняется определенной закономерности.

в. В образовавшихся продуктах наблюдается эквивалентное соотношение $A : T$ и $G : C$, о чем говорят суммы чисел в колонках. Тем самым подтверждается, с одной стороны, обоснованность использованного аналитического приема, а с другой — полная репликация ДНК-затравки.



Фиг. 68. Метод анализа ближайшего соседствования.

г. Из полученных результатов следует, что во вновь синтезированной ДНК происходит образование пар оснований и что обе ее цепи характеризуются противоположной полярностью [167].

По модели Уотсона — Крика двум цепям двойной спирали присуща противоположная полярность (стр. 68). При этом считается, что каждая цепь может выполнять роль матрицы при формировании новой цепи, осуществляя точную репликацию, приводящую к образованию двух дочерних спиралей, идентичных друг другу и родительской ДНК. Результаты, полученные с помощью анализа ближайшего соседствования, подтверждают этот механизм. Например, последовательность АфА встречается так же часто, как и последовательность ТфТ; такая же закономерность наблюдается для пар ГфГ и ЦфЦ. Соответствие остальных последовательностей зависит от того, обладают ли цепи двойной спирали одинаковой или противоположной полярностью (фиг. 69).

В случае противоположной полярности цепей должно наблюдаться соответствие между следующими последовательностями:

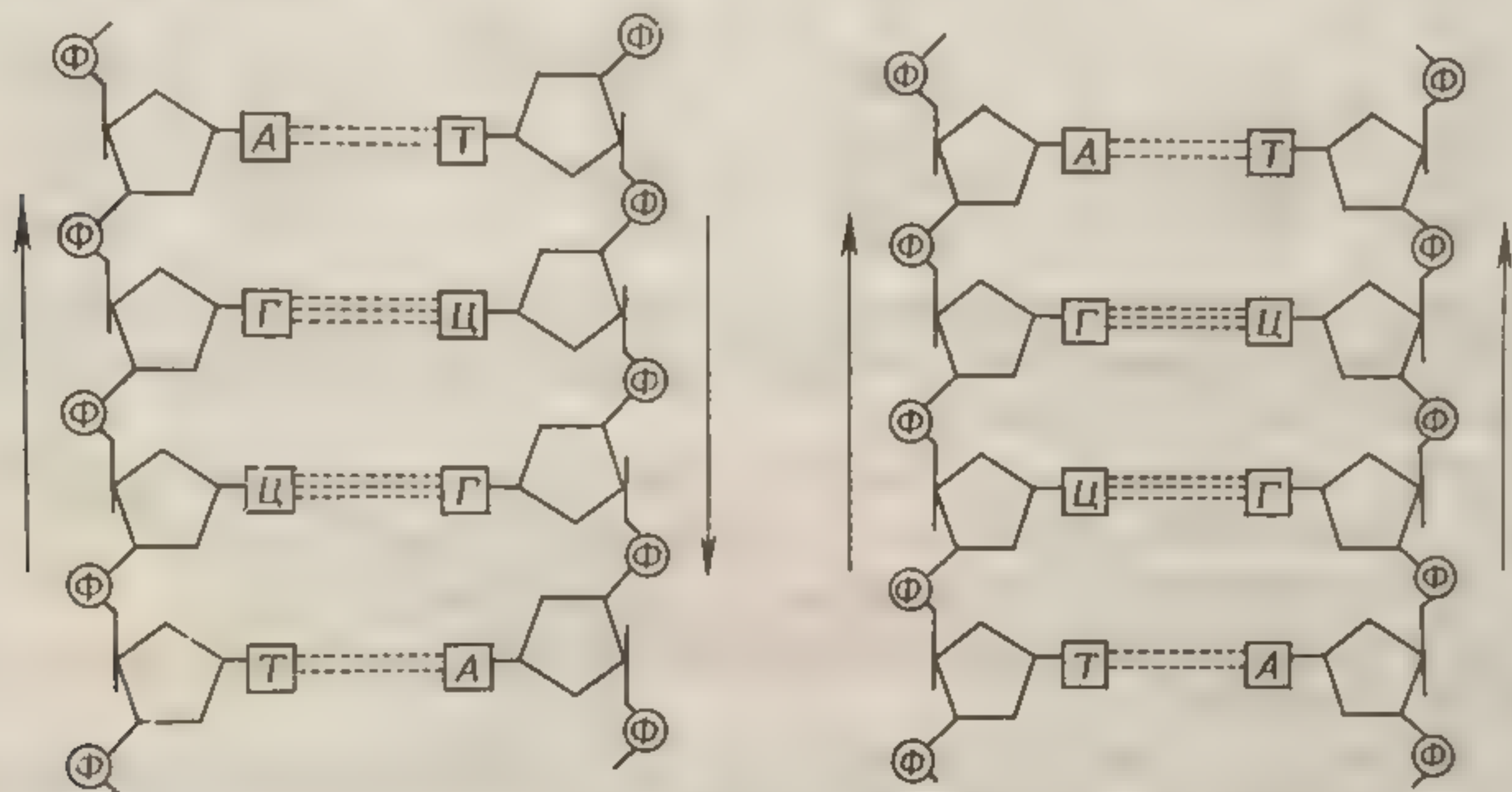
ЦфА и ТфГ
ГфА и ТфЦ
ЦфТ и АфГ
ГфТ и АфЦ

При одинаковой же полярности цепей будут подбираться следующие сочетания:

ТфА и АфТ
ЦфА и ГфТ
ГфА и ЦфТ
ТфГ и АфЦ
АфГ и ТфЦ
ЦфГ и ГфЦ

Экспериментальные данные (табл. 17) свидетельствуют о противоположной полярности цепей.

Последовательности АфА, ТфТ, ЦфЦ и ГфГ подбираются в обеих моделях одинаково.



Фиг. 69. Возможное строение молекул ДНК с одинаковой (справа) и противоположной (слева) полярностью цепей.

д. Приведенные данные о частоте ближайших соседей относятся ко вновь синтезированной ДНК. Чтобы проверить, действительно ли частота ближайшего соседствования в этой ДНК точно отражает частоту ближайшего соседствования в нативной ДНК-затравке, был поставлен специальный опыт. Таким же методом анализировали частоту ближайшего соседствования во вновь синтезированной ДНК, но в качестве затравки взяли не нативную ДНК, а ДНК, полученную предварительно ферментативным путем, в которой только 5% составляла исходная ДНК-затравка из зобной железы телят. Результаты этого опыта (табл. 18) показывают, что частота ближайшего соседствования в синтезированной в опыте ДНК такая же, как и в ДНК, полученной на нативной ДНК-затравке. ДНК из других источников дали совершенно иные результаты.

Следовательно, можно утверждать, что ДНК-полимераза синтезирует ДНК с цепями противоположной полярности и что после-

Таблица 18

Частота ближайшего соседствования в нативной и синтезированной ДНК из зубной железы телят [45]

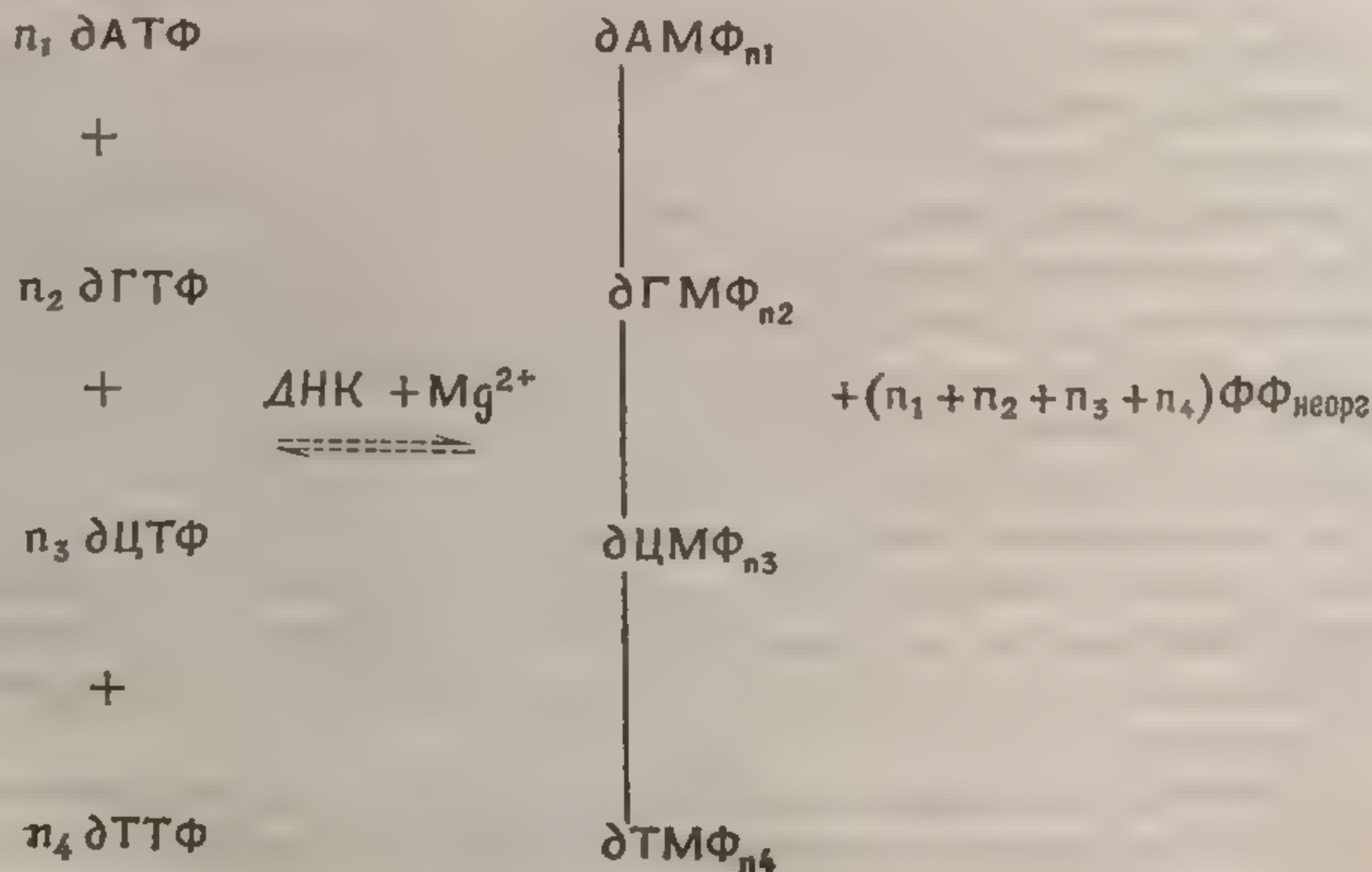
Пары ближайших соседей		В качестве затравки использована нативная ДНК из зубной железы телят		В качестве затравки использована ДНК из зубной железы телят, синтезированная ферментативным путем	
АфА	ТфА	0,089	0,053	0,088	0,059
АфГ	ТфГ	0,072	0,076	0,074	0,076
АфЦ	ТфЦ	0,052	0,067	0,051	0,064
АфТ	ТфТ	0,073	0,087	0,075	0,083
<hr/>		<hr/>		<hr/>	
ГфА	ЦфА	0,064	0,064	0,063	0,078
ГфГ	ЦфГ	0,050	0,016	0,057	0,011
ГфЦ	ЦфЦ	0,044	0,054	0,042	0,055
ГфТ	ЦфТ	0,056	0,067	0,056	0,068

довательность оснований в матрице при ферментативном синтезе полностью воспроизводится.

Теперь мы можем представить себе общую картину ферментативного биосинтеза ДНК. Он протекает в три стадии:

1. Образование дезоксирибонуклеозидмонофосфатов.
2. Их фосфорилирование до трифосфатов при участии соответствующих киназ.

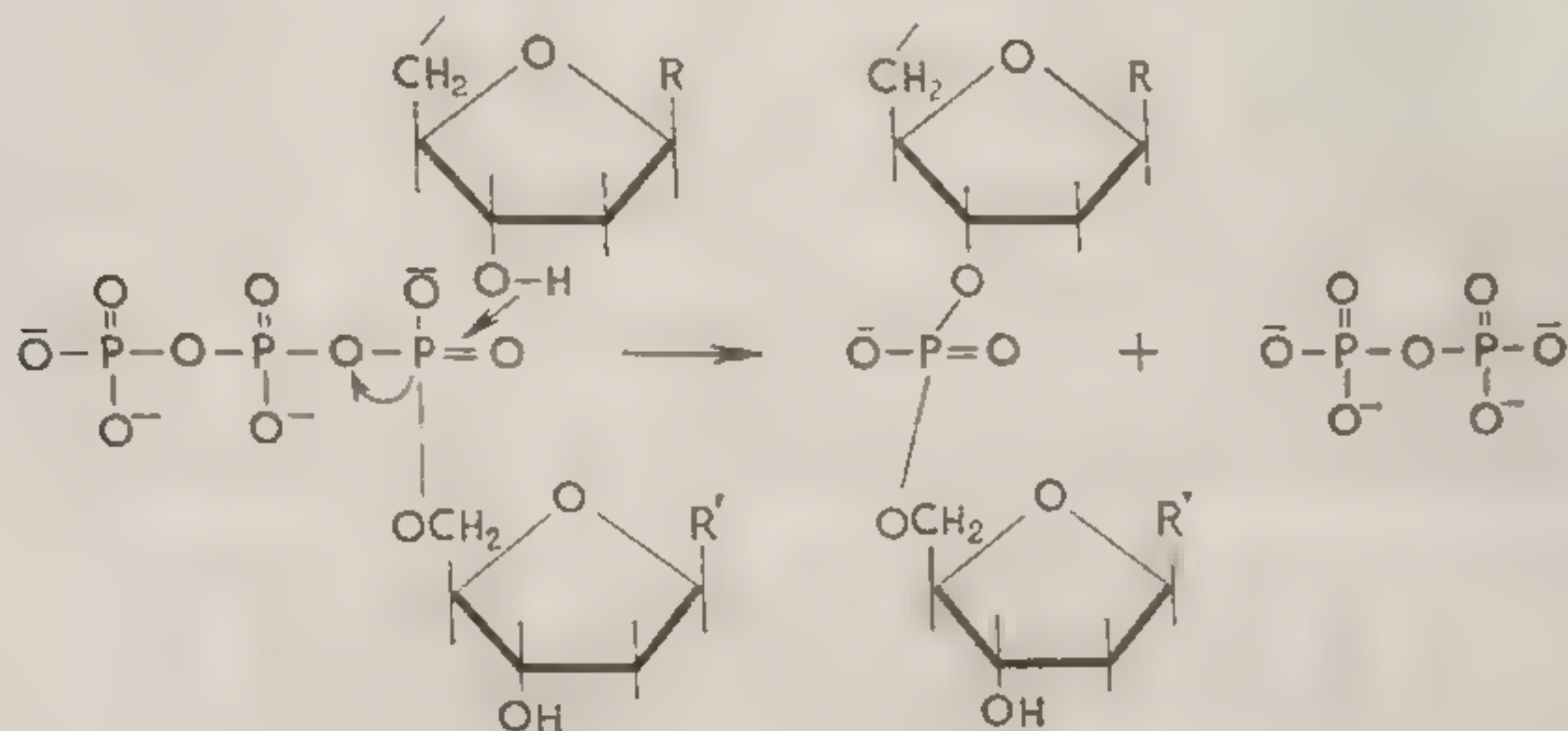
3. Полимеризация трифосфатов в ДНК под действием полимеразы (нуклеотидилтрансферазы) в присутствии ионов магния и соответствующей затравки. Схематически этот этап можно представить следующим образом:



Фиг. 71

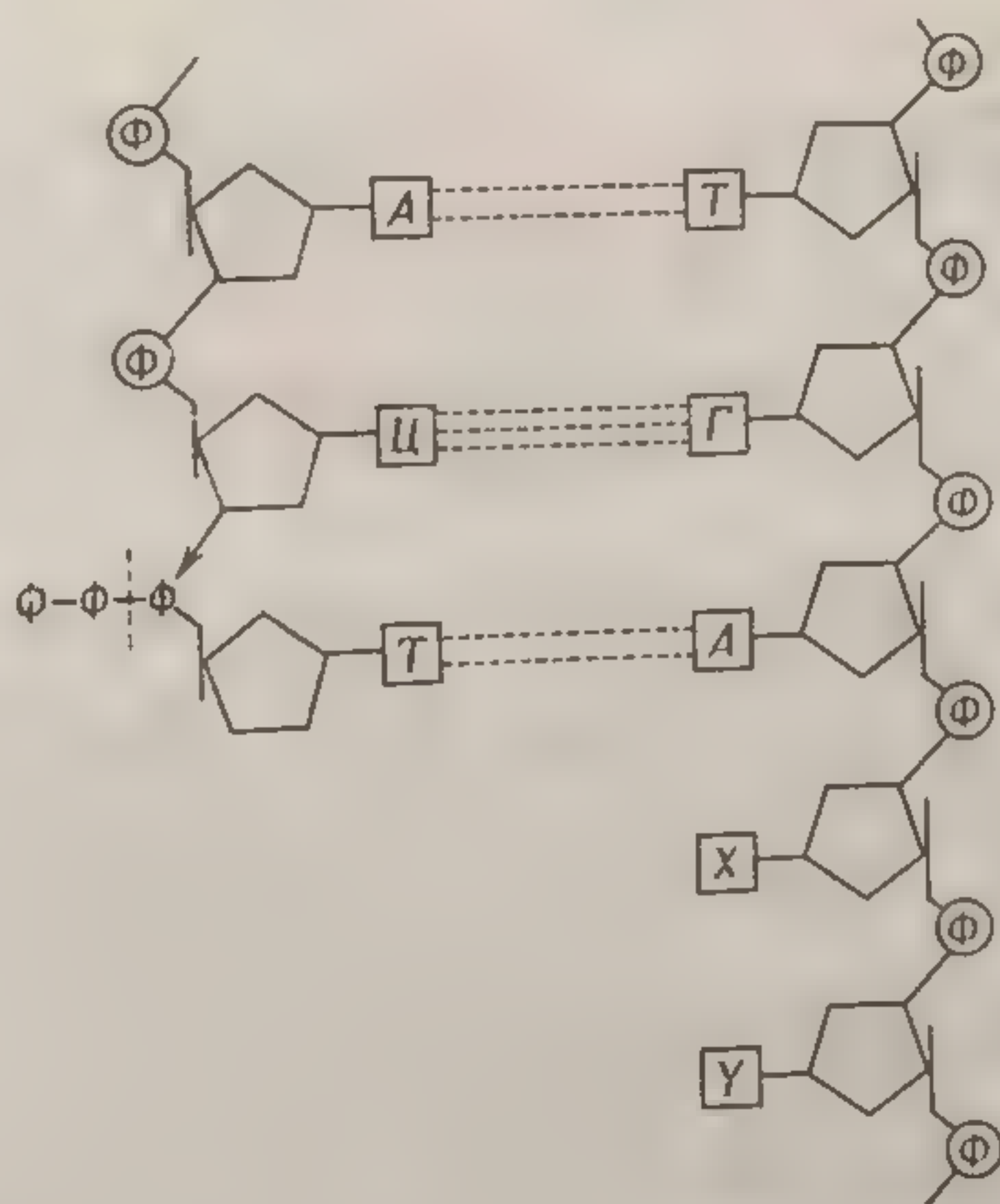
ции ос
ная це
реакци
изобра
1 4 Дж.

В механизме синтеза ДНК участвует нуклеофильная атака активированного пирофосфатом дезоксирибонуклеозид-5'-фосфата



Фиг. 70. Механизм действия ДНК-полимеразы.

гидроксильной группой (в положении 3) на растущем конце полидезоксирибонуклеотидной цепи (фиг. 70). В результате этой реак-

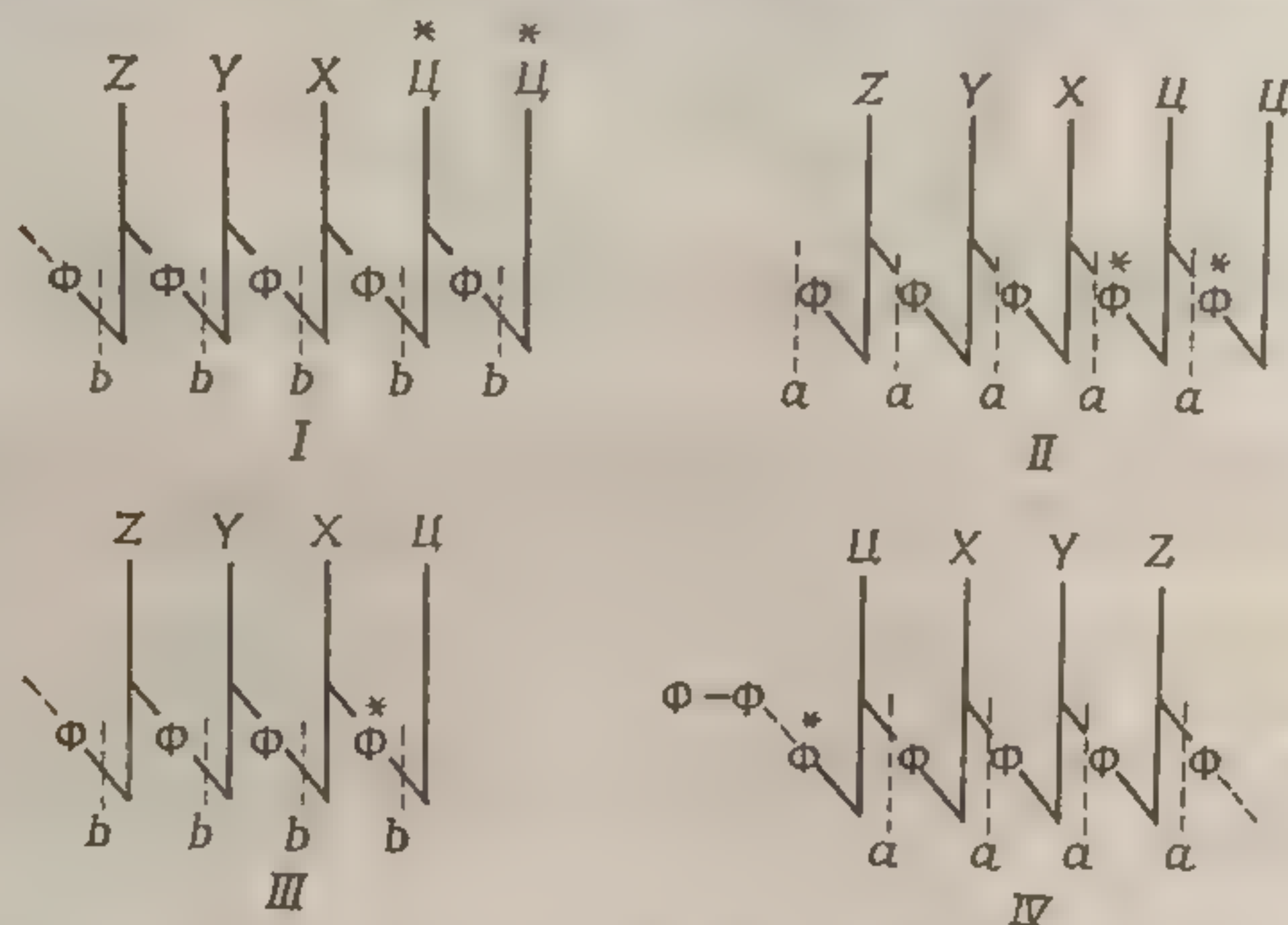


Фиг. 71 Упрощенная схема механизма репликации ДНК по Корнбергу.

ции освобождается неорганический пирофосфат и полинуклеотидная цепь удлиняется на одно звено. Как и следовало ожидать, эта реакция тормозится пирофосфатом. Схематически весь процесс изображен на фиг. 71.

Концевое и неконцевое включение

Известно, что в присутствии только одного меченого трифосфата включение его в ДНК протекает очень медленно (стр. 199). Однако, если радиоактивность этого трифосфата достаточно велика, интенсивность его включения может быть все же точно измерена. Если пометить таким путем ДНК-затравку с помощью только одного C^{14} -дЦТФ и затем обработать ее дезоксирибонуклеазой II и диэстеразой селезенки (гл. VI), то 66—70% радиоактивности обнаруживается в виде меченого дезоксицитидина (фиг. 72, I).



Фиг. 72. Концевое и неконцевое включение одной молекулы дЦМФ. Диэстераза из селезенки разрывает связь в точке *b*, диэстераза змеиного яда — в точке *a*.

а остальная — в виде меченого 3'-дЦМФ. Можно предположить, что включение заключается в добавлении одного или двух дЦМФ-остатков к нуклеозидному концу ДНК-затравки [27]. Эта точка зрения подтверждается опытами с диэстеразой змеиного яда, которая последовательно освобождает 5'-дезоксирибонуклеотиды с концов молекулы ДНК, начиная с нуклеозидного конца. Если дать метку только в виде дЦТФ, меченного по самому внутреннему атому фосфора (дЦФ*ФФ), то диэстераза змеиного яда быстро отщепит от ДНК почти все радиоактивные нуклеотиды в виде кислоторастворимых веществ, прежде чем гидролиз зайдет настолько далеко, чтобы в заметных количествах обнаружилось вещество (фиг. 72 II), поглощающее ультрафиолет. Когда в ДНК вводят метку в виде P^{32} -дЦМФ, то после гидролиза продукта ДНК-азой II или диэстеразой селезенки до 3'-дезоксирибонуклеотидов метку обнаруживают во всех 3'-дезоксирибонуклеотидах. Следовательно, фермент может присоединять меченый дЦМФ к концевым дАМФ, дГМФ, дЦМФ и дТМФ (фиг. 72, III). Если

во время включения метки реакция протекает между меченым дЦТФ и активированным (фосфорилированным) концом цепи ДНК (фиг. 72, IV), то после гидролиза эстеразой змеиного яда P^{32} окажется соединенным только с дезоксицитидином.

Экстракты из тканей животных содержат фермент, осуществляющий добавление нуклеотидильных звеньев к *концам* полинуклеотидных цепей. Обычная ДНК-полимераза требует присутствия всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, ионов магния и ДНК-затравки, представляющей собой одноцепочечный полинуклеотид, на котором собирается новая, комплементарная цепь. Поэтому фермент можно назвать «репликационным» ферментом; его активность подавляется при отсутствии одного или нескольких трифосфатов. Второй фермент, описанный в 1962 г. [46], катализирует включение концевых нуклеотидных звеньев в молекулу ДНК-затравки за счет отдельных трифосфатов. Он не стимулируется добавлением остальных трех трифосфатов, но цистеин усиливает его активность. Его можно назвать *концевым* или *терминальным* ферментом [47, 48]; его можно использовать при биосинтезе полидезоксиадениловой кислоты [49].

При измерениях активности обоих ферментов различия заключаются в следующем: инкубационная смесь для «репликационного» фермента должна содержать все четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата, причем один из них, дТТФ, метится по самому внутреннему атому фосфора. Для концевой фермента достаточно иметь в опыте только один трифосфат, т. е. меченый дТТФ.

Деятельность обоих ферментов различается очень резко, что хорошо видно при сравнении образующихся веществ. Продукт, синтезированный с помощью концевой фермента, был обработан фосфодиэстеразой змеиного яда, последовательно «состригающей» нуклеотидные звенья с 3'-гидроксильного конца цепи. За 4 час 97% включившейся метки перешло в кислоторастворимые соединения, причем эти нуклеотиды составляли лишь 8% всего синтезированного полинуклеотида. Отсюда видно, что имело место концевое включение меченого нуклеотида. С другой стороны, из продукта, образовавшегося под действием «репликационного» фермента, за то же время высвобождалось только 55% радиоактивности. Отсюда следует, что значительная часть включившейся метки не локализована на концевом участке ДНК или возле него.

Очень легко продемонстрировать разницу между обоими ферментами, изменяя ионный состав среды. Изучение этих ферментов при разных концентрациях ионов магния и калия показало, что оптимум действия каждого из ферментов находится при разных концентрациях ионов магния и калия в растворе.

Однако наиболее четкие различия между обоими ферментами наблюдаются в присутствии актиномицина D, хорошо известного

ингибитора ДНК-полимеразы и ДНК-зависимой РНК-полимеразы (стр. 234, 235). Действие актиномицина D заключается в блокировании поверхности цепи ДНК-затравки путем присоединения к остаткам гуанина. Таким образом, актиномицин D является мощным ингибитором «репликационного» фермента. Вполне логично предположить, что актиномицин D окажет гораздо меньший эффект на концевое включение; он будет тормозить присоединение метки только к тем молекулам затравки, которые содержат дезоксигуаниловые остатки на 3'-гидроксильном конце или возле него. Действительно, оказалось, что два фермента обладают совершенно различной чувствительностью к актиномицину D [35].

Относительная активность обоих ферментов колеблется в зависимости от ткани организма. «Репликационный» фермент присутствует в больших количествах в таких органах, в которых идет активный синтез ДНК (зобная железа, аппендикс, опухолевые клетки), и в малых количествах в таких тканях, как печень. «Концевой» фермент гораздо слабее представлен во всех тканях. Наиболее богата им зобная железа, в частности у телят [48]. Пока не ясно, в какой степени это свойство отражает своеобразные физиологические функции зобной железы.

Сополимер д(А—Т)

Если инкубировать ДНК-полимеразу в присутствии дАТФ, дТТФ и понов магния, но без ДНК-затравки, то образуется интересный полимер, содержащий аденин- и тиминнуклеотиды [18, 50]. Полимер начинает синтезироваться только после лаг-периода в несколько часов; затем процесс протекает с большой скоростью. Синтез заканчивается лишь после того, как будет использовано 60—80% трифосфатов. Если такой полимер выделить и затем внести его как затравку в среду в присутствии ДНК-полимеразы и двух из четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, то будет наблюдаться очень быстрый и интенсивный синтез идентичного полимера.

Образовавшийся полимер будет содержать равные количества аденина и тимина независимо от того, была ли внесена затравка или нет. Анализ частоты ближайшего соседствования показал, что, в то время как последовательности АфТ и ТфА встречаются с частотой 0,5 каждая, последовательностей АфА и ТфТ обнаружить не удалось. Значит, полимер состоит из чередующихся остатков А и Т.

Молекулярный вес полимера колеблется в пределах от $2 \cdot 10^6$ до $8 \cdot 10^6$, что следует из определений вязкости и коэффициента седиментации. При 71° полимер быстро «плавится», что сопровождается увеличением поглощения при 260 мкм на 37%. При

охлажден
ческие св
анализа
ставляет
и что це
шими ме
О сущест
(стр. 67)
Если
жащие

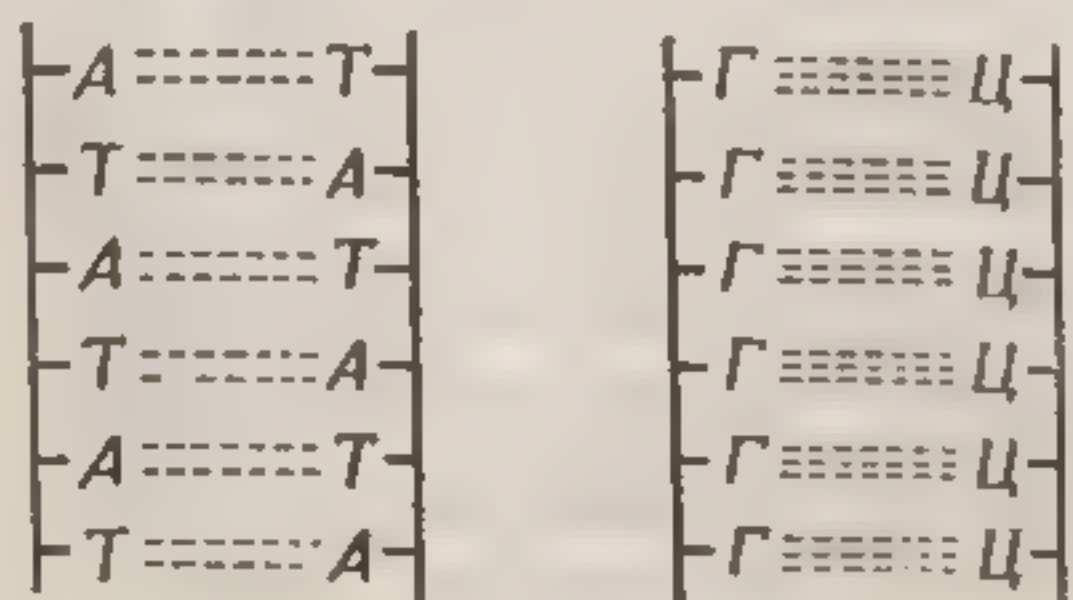
Фиг.
д-(А—Т)
мер (дГ

с черед
остатка
при об
активн
длине.

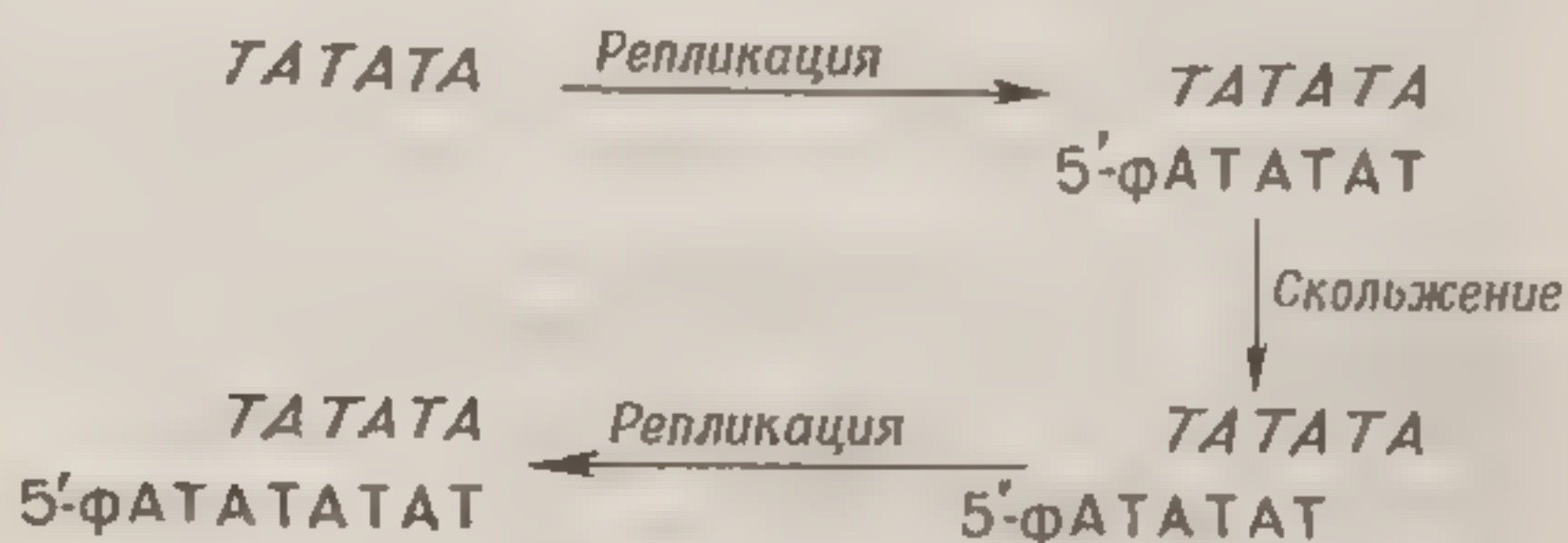
Кор
низм,
нуклео
На пер
вание
Затем
ся» та
цы, д
такого
сразу
ного с
акты
корот
строг
всего
нее п
водо

охлаждении наблюдается полная обратимость процесса. Эти физические свойства полимера, а также данные рентгеноструктурного анализа позволяют предположить, что молекула полимера представляет собой длинную волокнистую двухцепочечную структуру и что цепи связаны друг с другом водородными связями, возникающими между аденином одной цепи и тимином другой (фиг. 73). О существовании такого природного полимера уже упоминалось (стр. 67).

Если искусственно синтезировать олигонуклеотиды [165], содержащие по 6—14 последовательностей (от $d(A-T)_3$ до $d(A-T)_7$),



Фиг. 73. Сополимер $d(A-T)$ — слева и сополимер $(dG) : (dC)$ — справа.



Фиг. 74. Возможный механизм действия $d(A-T)_3$ в качестве матрицы (показана курсивом). Вновь образованная цепь (прямой шрифт) движется, скользя вдоль матрицы и освобождая новую пару оснований для дальнейшей репликации на них.

с чередующимися дезоксиаденилатными и дезокситимидилатными остатками, то такие олигонуклеотиды могут служить затравкой при образовании $d(A-T)$ -сополимера [51], причем затравочная активность таких олигонуклеотидов прямо пропорциональна их длине.

Корнберг и его сотрудники [51, 149] предположили, что механизм, обуславливающий затравочную активность такого олигонуклеотида, как $d(A-T)$, носит следующий характер (фиг. 74). На первом этапе происходит репликация матрицы, причем образование новой цепи начинается с 3'-гидроксильного конца матрицы. Затем вновь образованная спираль «плавится» и вновь «отжигается» таким образом, что в результате освобождается участок матрицы, делая возможным дальнейшую репликацию. В результате такого соскальзывания новая цепь сдвигается вдоль матрицы сразу на целое звено AT , что обеспечивает условия для правильного образования пар оснований. Повторяющиеся последовательно акты репликации и соскальзывания позволяют образовать на короткой матрице длинный полимер $d(A-T)$. Процесс этот строго зависит от температуры: в то время как $d(A-T)_4$ лучше всего работает как затравка при 10° , $d(A-T)$ гораздо продуктивнее при 37° , поскольку он связан со своей репликой множеством водородных связей, что затрудняет скольжение.

(дГ):(дЦ)-сополимер

Полимер, отчасти похожий на д (А—Т), можно получить при инкубации полимеразы в среде с высоким содержанием дГТФ и дЦТФ в присутствии ионов магния. Как и при образовании полимера д (А—Т), в начале реакции наблюдается лаг-период, составляющий несколько часов; его можно избежать, если использовать продукт реакции как затравку. В результате синтезируется полимер, содержащий гуанин и цитозин, причем соотношение обоих оснований в полимере не всегда одинаково. Анализ ближайшего соседствования показывает, что последовательности ГфГ и ЦфЦ встречаются с частотой 0,5 каждая. При мягком кислотном гидролизе освобождаются все дГМФ, но не выделяются дЦМФ. Судя по данным о седиментации и вязкости, полученный полимер сходен с д (А—Т)-полимером, однако температура «плавления» его несколько выше (83°). Эти данные находятся в полном соответствии с утверждением, что молекула нашего полимера состоит из двух гомополимеров: одного, содержащего только гуанин, и второго, содержащего только цитозин. Оба полимера на протяжении всей длины связаны водородными связями (фиг. 73). Две цепи, очевидно, могут быть различного размера, потому что количества гуанина и цитозина неэквивалентны и потому что интенсивность включения дГТФ и дЦТФ может быть различной.

Можно также получить подобные полимеры, содержащие аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований. Например, в обеих цепях д (А — Т)-полимера тимин можно заменить бромурацилом, что приведет к синтезу д (А — БУ)-сополимера. Если же такая замена произойдет только в одной цепи [18], то образуется гибридный сополимер д (А — Т) : д (А — БУ).

Репликация одноцепочечной ДНК

Одна из очень интересных проблем заключается в том, каким образом воспроизводит саму себя одноцепочечная ДНК фага ϕ X174 [51—54]. В опытах *in vitro* эта ДНК, безусловно, является превосходной затравкой для ДНК-полимеразной реакции. В результате этой реакции возникает двойная спираль, каждая цепь которой может служить затравкой при дальнейшей репликации. Существование такой двухцепочечной репликативной формы *in vivo* было доказано в опытах, в которых бактериальные клетки, выращенные на среде с P^{31} и N^{14} , заражали фагом, меченым P^{32} и N^{15} . Затем из таких зараженных клеток выделяли ДНК во время ее репликации. При анализе в градиенте плотности оказалось, что ДНК имеет двухцепочечное строение, причем обе цепи содержат некоторое количество меченых атомов, доставшихся им от

фага-родителя. Плотность более тяжелой фракции соответствовала плотности, предполагаемой для ДНК меченого N^{15} фага $\phi X174$, имеющую обычную одноцепочечную структуру. Легкая полоса имела плотность, характерную для гибридной ДНК, состоящей из двух цепей, одна из которых представляет собой N^{15} -ДНК, а другая — N^{14} -ДНК. Эта гибридная ДНК при нагревании ведет себя так же, как обычная двухцепочечная ДНК. Судя по ее составу, пары оснований обеих цепей соответствуют друг другу. Такая репликативная форма ДНК может быть использована для заражения бактериальных протопластов в той же мере, что и одноцепочечная ДНК фага $\phi X174$. Считают, что репликативная форма представляет собой двухцепочечное замкнутое кольцо [55—57, 98].

Очевидно, что на некоторых стадиях развития фага происходит возврат к одноцепочечной форме. Поскольку в зараженной клетке нет фонда одноцепочечных молекул, следует считать, что одинарные цепи включаются в фаговое потомство в тот момент, когда оно возникает.

Синтез ДНК в клетках *Escherichia coli*, зараженных фагом

При заражении клеток *E. coli* Т-четными фагами вся организация клеток изменяется таким образом, что в них продуцируется новая, фаговая ДНК, отличающаяся от ДНК хозяина тем, что она содержит оксиметилцитозин (ОМЦ) вместо цитозина (стр. 157). Такой поворот событий приводит к образованию в зараженной клетке новых (фиг. 75), весьма интересных ферментов [18, 58—65, 100].

а. Уже через несколько минут после заражения возникает фермент оксиметилаза, превращающий дЦМФ в оксиметилдезоксипитидинмонофосфат (дОМЦМФ).

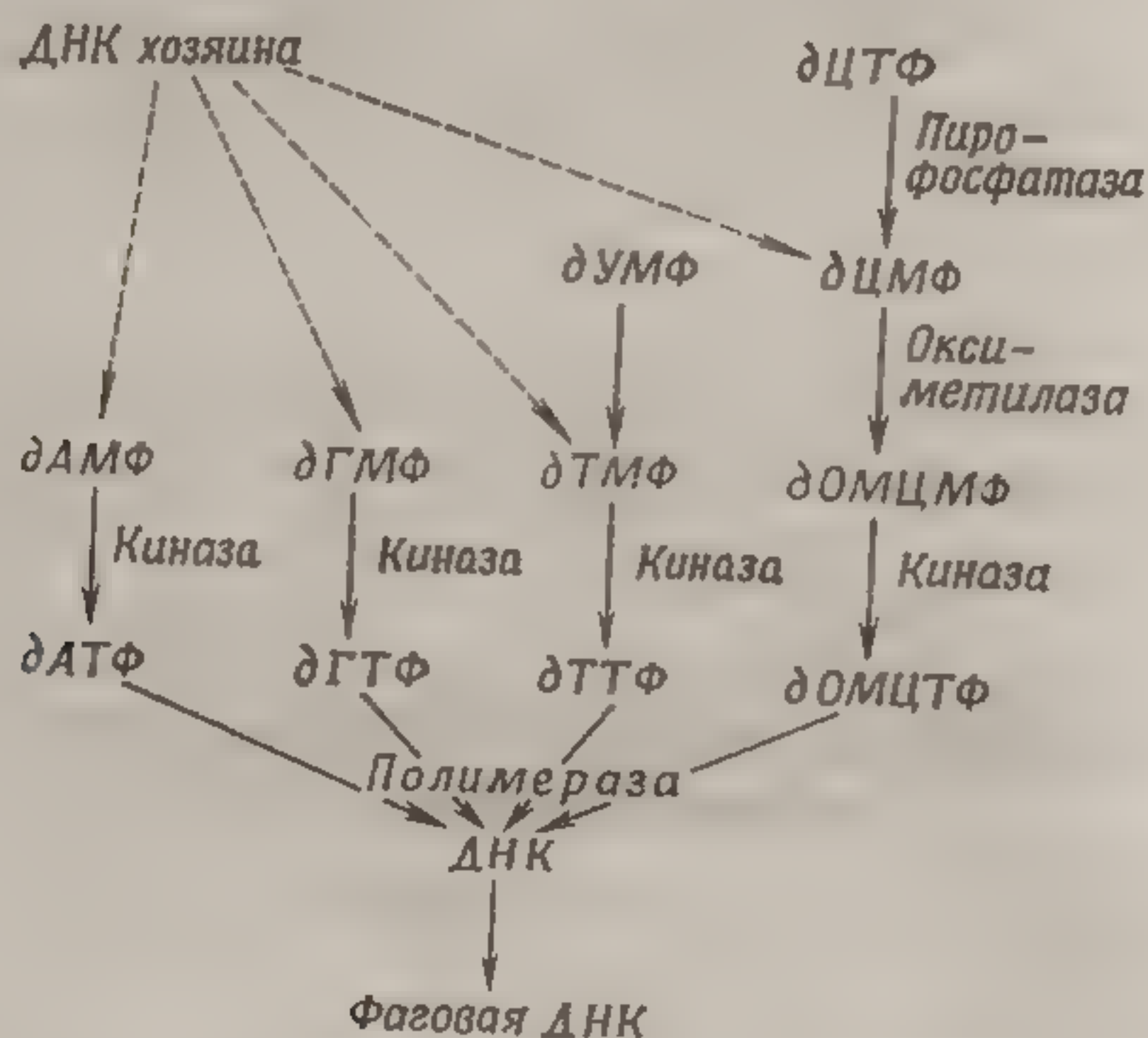
б. Примерно в тот же промежуток времени образуется киназа, фосфорилирующая дОМЦМФ до соответствующего трифосфата (дОМЦТФ).

Ни один из этих новых ферментов не был обнаружен в клетках, зараженных фагом Т5, который не содержит ОМЦ.

В зараженных клетках значительно возрастает активность киназ, фосфорилирующих ТМФ, и дГМФ, но не наблюдается усиления активности дАМФ-киназы. Большая активность этих ферментов обусловлена их новообразованием, причем новообразованные киназы можно отличить от киназ клеток хозяина, действовавших до заражения.

в. Образованию ДНК хозяина препятствует появление пиррофосфатазы, которая превращает дЦТФ в пиррофосфат и дЦМФ. Последний используется затем как субстрат для оксиметилазы.

г. Известно, что при заражении Т-четными фагами индуцируется пять различных глюкозилтрансфераз. Они переносят глюкозные остатки от уридиндифосфатглюкозы на ОМЦ фаговой ДНК в соотношениях, приведенных в табл. 15. Глюкозилаза, найденная в клетках, зараженных фагом Т2, переносит глюкозные остатки на ОМЦ в α -конфигурации. После заражения фагом Т4 продуцируются две глюкозилтрансферазы: одна добавляет глюкозильный остаток в ОМЦ в α -положении, а другая — в β -конфигурации.



Фиг. 75. Ключевые ферменты, участвующие в образовании ДНК Т-четных фагов.

При заражении фагом Т6 также образуются две глюкозилтрансферазы; одна из них присоединяет моноглюкозильный остаток к ОМЦ в α -положении, а другая добавляет к этому глюкозному остатку второй, причем между глюкозилами возникает β -конфигурация.

д. Кроме того, заражение фагом приводит к появлению новой полимеразы. Она отличается от полимеразы клеток хозяина по своим антигенным свойствам и по поведению на фосфоцеллюлозной колонке. Новая полимераза обладает также большей чувствительностью к ингибирующему действию *n*-хлормеркурбензоата и по-иному реагирует на различные затравки. Возникший после заражения фермент практически инертен, если в качестве затравки взята нативная ДНК, но достаточно активен при использовании в качестве затравки нагретой ДНК. В этом отношении он сходен с полимеразой клеток млекопитающих (стр. 201, 202).

На фиг. 75 схематически показано влияние фаговой инфекции на ферментные системы. Очевидно, у большинства клеток, как бактериальных, так и животных, эффект вирусной инфекции

заключается в образовании новых полимераз (ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы, стр. 248), а не в усилении синтеза полимераз, характерных для клеток хозяина.

Мутации и мутагены

Состав ДНК может меняться различными путями. Например, имеющиеся основания могут быть заменены другими или вовсе выпасть из молекулы; кроме того, в цепочку ДНК могут включаться новые основания. Случайные ошибки при нормальной дупликации ДНК дают начало *спонтанным мутациям*. Такие ошибки встречаются удивительно редко [66, 161]. Частота спонтанных мутаций зависит от температуры, рН, состава питательной среды и т. д. Однако частоту мутаций можно значительно увеличить, если подвергнуть клетки действию ультрафиолетового или ионизирующего излучения (стр. 221) или же определенных химических веществ, получивших общее название *мутагены*. К мутагенам относятся аналоги оснований, некоторые красители акридинового ряда, алкилирующие агенты, некоторые антибиотики, уретан, гидроксилламин и азотистая кислота. Азотистая кислота успешно применяется при изучении мутаций у некоторых вирусов, например вируса табачной мозаики (стр. 154 и 275).

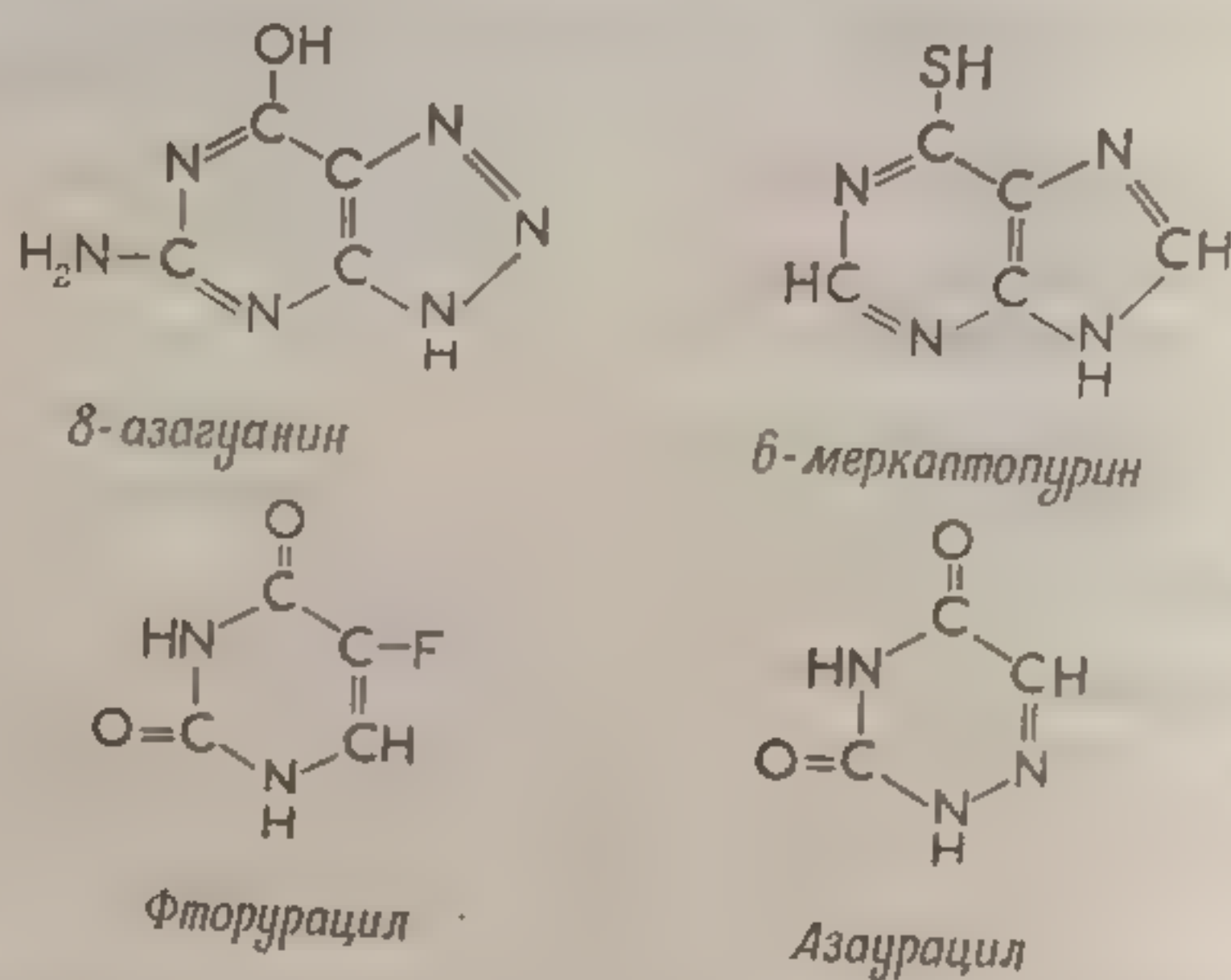
Мутагенным веществам посвящена обширная литература [66—68, 108]. Поскольку хорошо известно, что между синтезом ДНК и размножением клеток существует тесная связь, в настоящее время предпринимается много попыток подавить деление клеток, особенно во вновь формирующихся (неопластических) тканях. веществами, способными ингибировать биосинтез нуклеиновых кислот. Это направление может оказаться особенно перспективным в изыскании средств для лечения рака. Мы уже отмечали (стр. 176), что азасерин и антагонисты фолевой кислоты используются как ингибиторы синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Сейчас мы рассмотрим некоторые другие соединения, применяемые для торможения синтеза нуклеиновых кислот и вызывающие искусственные мутации.

Аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований

Некоторые полученные в лаборатории аналоги легко включаются в РНК и ДНК и могут оказывать сильное мутагенное действие [66]. К наиболее важным соединениям такого типа относятся галоидзамещенные пиримидины. Например, 5-бромурацил (БУ) может замещать тимин в молекуле ДНК, образуя пару с аденином. Если БУ находится в енольной форме, встречающейся доволь-

но редко, он может образовать пару не с аденином, а с гуанином. Это в свою очередь приведет к ошибке при включении или при репликации, заключающейся в замене пары А — Т на Г — Ц и наоборот.

Было испытано действие многих аналогов пуриновых и пиримидиновых оснований на рост, особенно в связи с проблемой химиотерапии рака (подробные обзоры см. [67, 69—74, 99, 109, 110]). Эти соединения обычно становятся на места соответствующих пи



Фиг. 76. Строение некоторых аналогов пурина и пиримидина.

оснований в молекулах нуклеиновой кислоты. Мы уже упоминали о биосинтезе «уродливых» ДНК, содержащих аналоги оснований (стр. 204).

Действие «посторонних» аналогов (фиг. 76) может быть, по крайней мере в некоторых случаях, двояким:

1. Как правило, они блокируют некоторые стадии биосинтеза обычных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Например, 8-азагуанин тормозит биосинтез ГМФ, а 6-меркаптопурин ингибирует превращение ИМФ в АМФ [75]. Обычно блокирование происходит после того, как сам ингибитор превращается в свой нуклеотид. Так, 4-азаурацил (иногда обозначаемый в литературе как 6-азаурацил) сначала превращается в свой нуклеозид, затем в 4-азауридинмонофосфат. Последний и оказывает ингибирующее действие на оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу, препятствуя тем самым биосинтезу пиримидинов [76, 77]; 5-фторурацил, оказываясь сильным ингибитором роста некоторых опухолей, превращается сначала в свой рибонуклеотид, потом в дезоксирибонуклеотид и уже в такой форме [78] оказывает блокирующее действие, подавляя превращение дУМФ в дТМФ (стр. 180).

2. Сами аналоги оснований после превращения в соответствующие нуклеотиды приобретают способность в той или иной степени включаться в РНК и (или) в ДНК, хотя включение это может

протекать и неправильно. Например, при избытке гуанина в среде 8-азагуанин может войти в состав РНК вируса табачной мозаики [79] и в еще большей степени в РНК *V. cereus* [80]. Только очень малые количества его включаются в ДНК. Если дать азагуанину включиться в РНК *V. cereus* и затем добавить в среду гуанин, то азагуанин быстро исчезнет из РНК, причем исчезновение это протекает слишком быстро, чтобы его можно было объяснить разбавлением препарата новой РНК, не содержащей азагуанина. Можно было бы думать, что этот факт объясняется обменом оснований, происходящим без разрыва рибозофосфатного скелета РНК. Однако такая возможность отпадает, поскольку при повторном эксперименте с гуанозинмонофосфатом вместо гуанина азагуанин высвобождается из РНК в виде нуклеозида [81]. Быстрый оборот азагуанина можно объяснить тем, что после включения азагуанина в РНК значительная часть его может быть освобождена с помощью рибонуклеазы в виде азагуанозин-2',3'-фосфата. В таком случае аналог должен занимать концевое положение в нуклеотидной цепи возле пиримидиннуклеотида. Поскольку таких группировок обнаруживается много, одна из сторон действия азагуанина, возможно, заключается в укорачивании полннуклеотидной цепи [71].

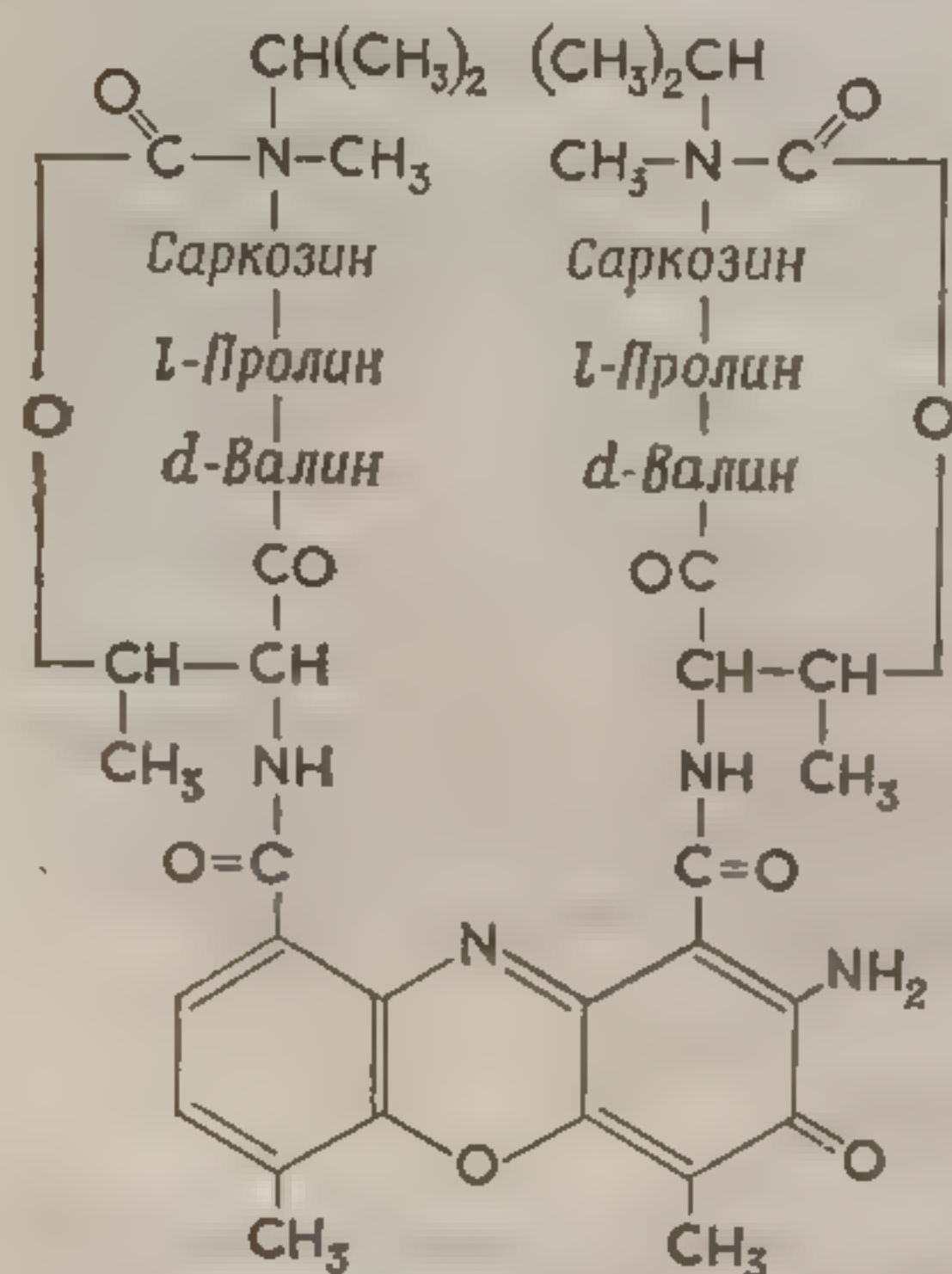
Алкилирующие агенты

Алкилирующие агенты обладают различной биологической активностью, в том числе мутагенностью, канцерогенностью и способностью подавлять рост опухолей [66, 68, 82]. Все эти соединения содержат одну, две или больше алкильных групп в реакционноспособной форме. К их числу относятся иприт, т. е. ди(2-хлорэтил)-сульфид, и его азотистый аналог, т. е. метилди(2-хлорэтил)амин.

Действие алкилирующих агентов на ДНК весьма сложно. Известно, что они реагируют с пуриновыми основаниями, в частности гуанином по N-7. Алкилирующие соединения, содержащие две реакционноспособные алкильные группы, могут образовывать сшивки между лежащими друг против друга цепями молекулы ДНК. Кроме того, алкилирование пуринов по N-7 приводит к появлению нестабильных четвертичных атомов азота. В результате алкилированный пурин может отщепиться от дезоксирибозы и его место останется пустым. Образовавшийся промежуток либо сам по себе может помешать репликации ДНК, либо он может быть заполнен каким-нибудь другим основанием [66]. Алкилированию могут подвергаться и фосфатные группы. Образующийся при этом фосфатный триэфир нестабилен и может распасться в результате разрушения связи между сахаром и фосфатом, что приведет к разрыву цепи ДНК.

Антибиотики и близкие им по действию агенты

Для изучения биосинтеза нуклеиновых кислот большое значение имеют некоторые антибиотики, задерживающие рост раковых опухолей. Одним из самых удобных является актиномицин D (фиг. 77), образующий комплексы с гуанином ДНК и тем самым блокирующий ДНК как матрицу. Поэтому актиномицин D ингибирует как ДНК-полимеразу, так и ДНК-зависимую РНК-полимеразу (стр. 234), причем у первой чувствительность к его действию гораздо ниже, чем у второй [83—89]. Так, например, если при концентрации актиномицина 1,0 мкМ ДНК-зависимая РНК-полимераза почти полностью подавлена, ДНК-полимераза ингибирована незначительно [90]. При образовании комплекса между актиномицином и гуанином пептидные цепи антибиотика, по-видимому, укладываются в малые желобки спирали ДНК [150].



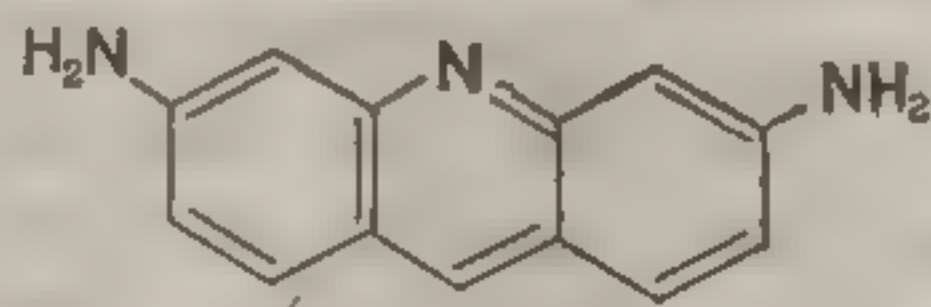
Фиг. 77. Строение актиномицина D.

Митомицин С тормозит синтез ДНК у бактерий, вызывая ковалентное сцепление комплементарных цепей ДНК [91—93]. Действие саркомицина, очевидно, заключается в ингибировании ДНК-полимеразы; возможно, блокированию подвергаются сульфгидрильные группы фермента. В концентрации 100 мкг/мл он подавляет биосинтез ДНК на 90%, а биосинтез ДНК-зависимой РНК-полимеразы — только на 20% [94].

Алкалоид винбластин ингибирует биосинтез растворимой РНК, не действуя при этом на рибосомную РНК [95]. Леворфанол [160, 162], производное морфина, ингибирует синтез рибосомной РНК (стр. 240). Антибиотик стрептоцигрин тормозит главным образом синтез ДНК у *Salmonella typhimurium*.

Красители

Профлавин (фиг. 78), один из красителей акридинового ряда, подавляет биосинтез ДНК-зависимой РНК-полимеразы: его моле-



Фиг. 78. Строение профлавина.

кулы укладываются между смежными слоями нуклеотидных пар в молекуле ДНК [83, 89, 96]. Мутагенное действие профлавина в отношении фагов широко используется при изучении кодирующих триплетов (стр. 271).

Действие понижающей радиации

Действию ионизирующей радиации на живые клетки посвящена масса работ. Мы не в состоянии обсуждать здесь обширную литературу по этой проблеме и отсылаем читателя к имеющимся сводкам [111, 112]. Здесь мы рассмотрим лишь действие ионизирующей радиации на метаболизм нуклеиновых кислот, также подробно освещенный в литературе [113—116, 138, 139, 153].

Хорошо известно, что быстро растущие ткани гораздо чувствительней к действию рентгеновских лучей, чем закончившие рост «зрелые» ткани. Сейчас считается доказанным, что облучение сильно тормозит процесс клеточного деления. Поэтому можно думать, что облучение должно оказывать заметное действие на метаболизм и биосинтез нуклеиновых кислот.

Давно было замечено [117—119], что после воздействия рентгеновскими лучами (доза 1000 r) включение меченого фосфора в ДНК саркомы Иенсена у крыс значительно понижается. Такое замедленное обновление ДНК наблюдалось в печени, селезенке и слизистой оболочке кишечника крыс. Если тканям дать возможность «отдохнуть» в течение нескольких дней после облучения, то ингибирующее действие облучения оказывается очень мало сниженным. Практически ингибирующее действие рентгеновских лучей снимается уже через несколько часов после облучения. Описанные результаты дают основание думать, что одна из сторон действия рентгеновских лучей заключается в торможении синтеза ДНК во время митоза.

Подобные данные были получены многими исследователями, изучавшими действие облучения на саркому Иенсена у крыс, регенерирующую печень крыс, зобную железу и аппендикс кроликов и другие органы (120—122). Во всех случаях оказывалось, что на РНК облучение действует в меньшей степени, чем на ДНК.

Все эти данные свидетельствуют, по-видимому, о том, что облучение специфически ингибирует какие-то этапы в биосинтезе ДНК. Однако такая интерпретация может ввести в заблуждение. Следует иметь в виду, что если включение метки изучают через несколько часов после облучения, то при облучении в смешанной популяции погибают чувствительные к рентгеновским лучам клетки или же изменяется соотношение различных типов клеток в популяции. Вследствие этих сдвигов в составе клеточной популяции может уменьшаться доля тех клеток, которые обычно легко вклю-

чали меченые предшественники прямо в ДНК. Тем самым достигается эффект замедленного включения метки в ДНК без всякого воздействия на биосинтез ДНК. Более того, у таких тканей, как зубная железа и селезенка, облучение приводит к «утрате» части клеток, что в свою очередь понижает содержание ДНК.

Некоторые из этих осложнений удалось обойти, используя для работы чистый клон клеток. Так, в опытах с фибробластами (клон L) было показано, что облучение подавляет деление клеток, не угнетая при этом синтеза ДНК. В результате образуются гигантские клетки, содержащие исключительно большие количества ДНК [123—125].

В длительных опытах результаты многих экспериментов, возможно, объясняются просто задержкой митозов и гибелью клеток, и нет необходимости изыскивать какой-либо биохимический механизм, ответственный за влияние облучения на синтез ДНК как таковой [126]. Но в кратковременных экспериментах, т. е. при изучении клеток не позднее 2 час после экспозиции, пониженное включение метки трудно объяснить изменением в составе клеточной популяции, и поэтому следует искать какую-то более непосредственную причину.

Как будет показано дальше (стр. 310), ДНК синтезируется в делящихся клетках во время интерфазы. Временная зависимость между синтезом ДНК и митотическим циклом впервые была изучена с помощью радиоавтографии на клетках кончика корня бобов [128] (*Vicia faba*). По отношению к синтезу ДНК в митотическом цикле различают следующие периоды (стр. 310): период синтеза ДНК (S), предшествующий ему предсинтетический период (G_1), который приходится на раннюю интерфазу, затем следующий после S-периода постсинтетический период (G_2) и следующий за ним митоз (D) [126, 129, 130]. Установлено, что включение P^{32} в ДНК ингибируется, если кончик корня облучают в течение G_1 -периода [131]. Если облучение происходит во время S-периода, то для подавления включения требуются гораздо большие дозы. Аналогичные результаты были получены в опытах с костным мозгом [129]. Они позволили выдвинуть гипотезу о существовании некой «системы, не идентичной синтезу ДНК, но связанной с ней и более чувствительной к рентгеновским лучам, чем процесс синтеза ДНК» [132]. Эта точка зрения нашла серьезное подтверждение в опытах с регенерирующей печенью крысы [120, 121, 133].

Понятно, что выдвинутая гипотеза подразумевает систему предшественников ДНК. Нет ничего удивительного в том, что в облученных клетках увеличивается количество кислоторастворимых дезоксирибонуклеотидов [134, 135], что можно объяснить либо распадом ДНК, либо накоплением ее предшественников. В пользу второго предположения говорят опыты по включению

дезоксирибонуклеозидтрифосфатов [136]. Согласно этим наблюдениям, облучение тормозит синтез ДНК не из-за недостатка предшественников, а либо из-за того, что клетка утрачивает способность к полимеризации, либо из-за каких-то повреждений в энергодающем механизме ядра [136]. В связи с этим важно отметить, что облучение даже в малых дозах подавляет в ядре фосфорилирование нуклеозидмонофосфатов до нуклеозидтрифосфатов [137].

Было отмечено, что облучение может оказывать и другие воздействия. Например, высказывалось предположение, что под действием рентгеновских лучей ДНК теряет свою активность в качестве матрицы как для ДНК-полимеразы, так и для РНК-полимеразы [127, 140—142]. Возможно также, что облучение каким-то образом влияет на способность клетки продуцировать ферменты, участвующие в биосинтезе ДНК. Данная точка зрения обсуждается в ряде весьма противоречивых работ [143—146], из которых следует, что критическое значение в этих исследованиях имеет тот промежуток времени, который протекает от момента облучения до момента взятия проб на активность ферментов.

Очень интересен вопрос о чувствительности к облучению рентгеновскими лучами галоидзамещенных ДНК [158, 159]. 5-хлор-, 5-бром- и 5-иоддезоксинуридины легко включаются в ДНК клеток бактерий и животных вместо тимидина, особенно в том случае, когда синтез ТМФ подавлен с помощью таких агентов, как, например, фтордезоксинуридин. В клетках, меченных бромдезоксинуридином, ДНК продолжает функционировать и клетки остаются жизнеспособными, однако очень резко возрастает чувствительность этих клеток к ультрафиолетовому и ионизирующему излучениям.

Действие ультрафиолетовых лучей

Подобно рентгеновским лучам, ультрафиолетовые лучи могут повредить клетки, особенно клетки, в ДНК которых включился бромдезоксинуридин [158, 159]. По-видимому, этот эффект связан со случайными «одноцепочечными ошибками» в замещенной ДНК. Однако поврежденные таким образом клетки обладают способностью «излечиваться», возможно выбрасывая поврежденные участки, содержащие димеры тимина, и заменяя их нуклеотидами, которые были удалены из ДНК [153—157].

ЛИТЕРАТУРА

1. Delbrück M., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 40, 783 (1954).
2. Lockingen L. S., de Busk A. G. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 41, 925 (1955).
3. Bloch D. P., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 41, 1058 (1955).

4. Stent G. S., Adv. Virus Res., 5, 95 (1958).
5. Levinthal C., Crane H. R., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 42, 436 (1956).
6. Longuet-Higgins H. C., Zimm B. H., J. Mol. Biol., 2, 1 (1960).
7. Cairns J., Endeavour, 22, 141 (1963).
8. Cairns J., J. Mol. Biol., 6, 208 (1963).
9. Cairns J., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 43 (1963).
10. Meselson M., Stahl F. W., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 66, 671 (1958).
11. Cavaliere L. F., Rosenberg B. H., The Molecular Basis of Neoplasia, p. 44, University of Texas Press (1962).
12. Cavaliere L. F., Rosenberg B. H., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 2, p. 1 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
13. Cavaliere L. F., J. Cell Comp. Physiol., 62, Suppl. 1, 111 (1963).
14. Baldwin R. L., Shooter E. M., J. Mol. Biol., 7, 511 (1963).
15. Taylor J. H., Molecular Genetics, Part I, p. 65 (J. H. Taylor, Ed.), New York, Academic Press (1963). (Молекулярная генетика, М., «Мир», 1964, стр. 78.)
16. Jacob F., Brenner S., Compt. rend. acad. sci., 256, 298 (1963).
17. Jacob F., Brenner S., Cuzin F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 329 (1963).
18. Kornberg A., The Enzymatic Synthesis of DNA, London, Wiley (1961).
19. Enzymes of polynucleotide metabolism, Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 511-804 (1959).
20. Josse J., The Molecular Basis of Neoplasia, p. 91, University of Texas Press (1962).
21. Richardson C. C., Schildkraut C. L., Aposhian H. V., Kornberg A., Bodmer W., Lederberg, Informational Macromolecules (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965 стр. 15.)
22. Richardson C. C., Schildkraut C. L., Kornberg A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 9 (1963).
23. Bessman M. J., Molecular Genetics, Part I, p. 1 (J. H. Taylor, Ed.), New York, Academic Press (1963). (Молекулярная генетика, М., «Мир», 1964, стр. 9.)
24. Lehman I. R., Bessman M. J., Simms E. S., Kornberg A., J. Biol. Chem., 233, 163 (1958).
25. Bessman M. J., Lehman I. R., Simms E. S., Kornberg A., J. Biol. Chem., 233, 171 (1958).
26. Bessman M. J., Lehman I. R., Adler J., Zimmerman S. B., Simms E. S., Kornberg A., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 44, 633 (1958).
27. Adler J., Lehman I. R., Bessman M. J., Simms E. S., Kornberg A., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 44, 641 (1958).
28. Richardson C. C., Schildkraut C. L., Aposhian H. V., Kornberg A., J. Biol. Chem., 239, 222 (1964).
29. Okazaki T., Kornberg A., J. Biol. Chem., 239, 259 (1964).
30. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Keir H. M., McArdle A. H., Nature, 182, 589 (1958).
31. Smellie R. M. S., Keir H. M., Davidson J. N., Biochim. Biophys. Acta, 35, 389 (1959).

32. Smellie R. M. S., Gray E. D., Keir H. M., Richards J., Bell D., Davidson J. N., *Biochim. Biophys. Acta*, 37, 243 (1960).
33. Smellie R. M. S., *Deoxyribonucleic Acid, Structure Synthesis and Function*, p. 89, London, Pergamon Press (1962).
34. Keir H. M., *Biochem. J.*, 85, 265 (1962).
35. Keir H. M., Omura H., Shepherd J. B., *Biochem. J.*, 89, 425 (1963).
36. Mantsavinos R., Canellakis E. S., *J. Biol. Chem.*, 234, 628 (1959).
37. Bollum F. J., Potter V. R., *Cancer Res.*, 19, 561 (1959).
38. Weissman S. M., Smellie R. M. S., Paul J., *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 101 (1960).
39. Bollum F. J., *J. Biol. Chem.*, 235, 2399 (1960).
40. Bollum F. J., *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 1, p. 1 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1965, стр. 9.)
41. Bollum F. J., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 21 (1963). (Ферменты и синтез биополимеров, М., «Мир», 1967, стр. 9.)
42. Bollum F. J., *J. Cell Comp. Physiol.*, 62, Suppl. 1, 61 (1963).
43. Keir H. M., Binnie B., Smellie R.M.S., *Biochem.*, 82, 493 (1962).
44. Jehle H., Ingeman M. L., Shirven R. M., Park W. C., Salyers A. A., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 738 (1963).
45. Josse J., Kaiser A. D., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, 236, 864 (1961).
46. Krakow J. S., Coutsogeorgopoulos C., Canellakis E. S., *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 639 (1962).
47. Keir H. M., Smith S. M. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 68, 589 (1963).
48. Keir H. M., Shepherd J. B., Hay J., *Biochem. J.*, 89, 9P (1963).
49. Bollum F. J., Groeniger E., Yoneda M., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 51, 853 (1964).
50. Schachman H. K., Adler J., Radding C. M., Lehman I. R., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, 235, 3242 (1960).
51. Swartz M. N., Trantner A., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, 237, 1961 (1962).
52. Sinsheimer R. L., *J. Chim. Phys.*, p. 986 (1961).
53. Sinsheimer R. L., *Sci. Amer.*, July, 3 (1962).
54. Hayashi M., Hayashi M. N., Spiegelman S., *Science*, 140, 1313 (1963).
55. Hayashi M., Hayashi M. N., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 51, 351 (1964).
56. Chandler B., Hayashi M., Hayashi M. N., Spiegelman S., *Science*, 143, 47 (1964).
57. Kleinschmidt A. K., Burton A., Sinsheimer R. L., *Science*, 142, 961 (1963).
58. Kornberg A., Zimmerman S. B., Kornberg S. R., Josse J., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 45, 772 (1959).
59. Somerville R., Ebisuyaki K., Greenberg G. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 45, 1240 (1959).
60. Pizer L. I., Cohen S. S., *J. Biol. Chem.*, 237, 1251 (1962).
61. Zimmerman S. B., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, 236, 1480 (1961).
62. Kornberg S. R., Zimmerman S. B., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, 236, 1487 (1961).

63. Zimmerman S. B., Kornberg S. R., Kornberg A., J. Biol. Chem., 237, 512 (1962).
64. Aposhian H. V., Kornberg A., J. Biol. Chem., 237, 519 (1962).
65. Josse J., Kornberg A., J. Biol. Chem., 237, 1968 (1962).
66. Freese E., Molecular Genetics, Part I, p. 207 (J. H. Taylor, Ed., New York, Academic Press (1963). (Молекулярная генетика, М., «Мир», 1964, стр. 226.)
67. Handschumacher R. E., Welch A. D., The Nucleic Acids, Vol. 3, p. 453 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1960). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1962, стр. 372.)
68. Krieg D. R., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 2, p. 125 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
69. Mandel H. G., Pharmacol. Rev., 11, 743 (1959).
70. Matthews R. E. F., Pharmacol. Rev., 10, 359 (1958).
71. Markham R., Eighth Symp. Soc. Gen. Microbiol., p. 163, Cambridge University Press (1958).
72. Skipper H. E., Bennett L. L., Ann. Rev. Biochem., 27, 137 (1958).
73. Rhoads C. P. (Ed.), Anti-metabolites and Cancer (American Association for the Advancement of Science) (1955).
74. Brown G. B., Ann. N.Y. Acad. Sci., 60, 185 (1954); Anti-metabolites and Cancer, p. 285 (1955).
75. Lasnitski J., Matthews R. E. F., Smith J. D., Nature, 173, 346 (1954).
76. Handschumacher R. E., Pasternak C. A., Biochim. Biophys. Acta, 30, 451 (1958).
77. Skoda J., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 3, p. 197 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
78. Bosch L., Harbers E., Heidelberger C., Cancer Res., 18, 335 (1958).
79. Matthews R. E. F., Nature, 171, 1065 (1953).
80. Hilmoe R. J., Heppel L. A., J. Amer. Chem. Soc., 79, 4810 (1957).
81. Mandel H. G., Markham R., Biochem. J., 65, 25P (1957).
82. Lawley P. D., The Molecular Bases of Neoplasia, p. 123, University of Texas Press (1962).
83. Goldberg I. H., Reich E., Rabinowitz M., Nature, 199, 44 (1963).
84. Reich E., Cancer Res., 23, 1428 (1963).
85. Reich E., Goldberg I. H., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 3, p. 184 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1964).
86. Kahan E., Kahan F. M., Hurwitz J., J. Biol. Chem., 238, 2491 (1963).
87. Kit S., Piekarski L. J., Dubbs D. R., J. Mol. Biol., 7, 497 (1963).
88. Goldberg I. H., Rabinowitz M., Reich E., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 2094 (1962).
89. Hurwitz J., Furth J. J., Malamy M., Alexander M., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1222 (1962).
90. Hurwitz J., August J. T., Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 1, p. 59 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Нуклеиновые кислоты, М., «Мир», 1965, стр. 74.)
91. Iver V. N., Szybalski W., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 355 (1963).
92. Matsumoto I., Lark K. G., Exper. Cell Res., 32, 192 (1963).

93. Seki (1960)
94. Sung
95. Crea (1961)
96. Ler
97. Lebi wick
98. Hay 140,
99. Welc
100. Cole tion,
101. Wal (1962)
102. Boll
103. Boll
104. Man (1959)
105. Smel Bioph
106. Man 1239
107. Furl
108. Wag Editi
109. Hite (R. M (1963)
110. Broc 239 (Press
111. Spea
112. Erre Eds.)
113. Kell (J. A
114. Lajt
115. Stoc (1958)
116. Hol
117. Hev
118. Hev
119. Hev
120. Sib
121. Smel son
122. Hol and C
123. Dick 18P
124. Dick
125. Nias
126. How and
127. Sta

93. Sekiguchi M., Takagi Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 434 (1960).
94. Sung S.-C., Quastel J. H., *Cancer Res.*, **23**, 1549 (1963).
95. Creasey W. A., Markiw M. E., *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 135 (1964).
96. Lerman L. S., *J. Cell. Comp. Physiol.*, **64**, Suppl. 1, 1 (1964).
97. Lehman I. R., *Methods in Enzymology*, Vol. 6, p. 34 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1963).
98. Hayashi M., Hayashi M. N., Spiegelman S., *Science*, **140**, 1313 (1963).
99. Welch A. D., *Cancer Res.*, **21**, 1475 (1961).
100. Cohen S. S., *Deoxyribonucleic Acid, Structure, Synthesis and Function*, p. 102, London, Pergamon Press, 1961.
101. Walwick E. R., Main R. K., *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 876 (1962).
102. Bollum F. J., Potter V. R., *J. Biol. Chem.*, **233**, 478 (1958).
103. Bollum F. J., Potter V. R., *Cancer Research*, **19**, 561 (1959).
104. Mantsavinos R., Canellakis E. S., *J. Biol. Chem.*, **234**, 628 (1959).
105. Smellie R. M. S., Keir H. M., Davidson J. N., *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 389 (1959).
106. Mantsavinos R., Canellakis E. S., *Cancer Research*, **19**, 1239 (1959).
107. Furlong N. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 154 (1960).
108. Wagner R. P., Mitchell H. K., *Genetics and Metabolism* (2nd Edition), London, Wiley, 1964.
109. Hitchings G. H., Elson G. B., *Metabolic Inhibitors*, p. 215 (R. M. Hochster and J. H. Quastel, Eds.), New York, Academic Press (1963).
110. Brockman R. W., Anderson E. P., *Metabolic Inhibitors*, p. 239 (R. M. Hochster and J. H. Quastel, Eds.), New York, Academic Press (1963).
111. Spear F. G., *Internat. Rev. Cytol.*, **7**, 1 (1958).
112. Errera M., *The Cell*, Vol. 1, p. 695 (J. Brachet and A. E. Mirsky, Eds.), New York, Academic Press (1959).
113. Kelly L. S., *Progress in Biophys. and Biophys. Chem.*, Vol. 3, p. 143 (J. A. V. Butler and B. B. Katz, Eds.) (1958).
114. Lajtha L. G., *Salt Lake City Conference* (1959).
115. Stocken L. A., *Proc. Inter. Congress Radiation Res.* (Aug. 5-11, 1958), *Radiation Res.*, Suppl. 1, p. 53 (1959).
116. Holmes B. E., *Ann. Rev. Nuclear Sci.*, **7**, 89 (1957).
117. Hevesy G. C., *J. Chem. Soc.*, p. 1618 (1951).
118. Hevesy G., *Rev. Mod. Phys.*, **17**, 102 (1945).
119. Hevesy G., *Nature*, **163**, 869 (1949).
120. Sibatani A., *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 592 (1957).
121. Smellie R. M. S., Humphrey G. F., Kay E. R. M., Davidson J. N., *Biochem. J.*, **60**, 177 (1955).
122. Holmes B. E., *Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism*, p. 225, London, Churchill (1956).
123. Dickson M., Paul J., Davidson J. N., *Biochem. J.*, **70**, 18P (1958).
124. Dickson M. S. H., Paul J., *Internat. J. Rad. Biol.*, **3**, 419 (1961).
125. Nias A. H. W., Paul J., *Internat. J. Rad. Biol.*, **3**, 431 (1961).
126. Howard A., *Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism*, p. 196, London, Churchill (1956).
127. Stacey K. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **5**, 486 (1961).

128. Howard A., Pelc S. R., Heredity, Suppl., 6, 261 (1953).
129. Lajtha L. G., Oliver R., Ellis F., Brit. J. Cancer, 8, 367 (1954).
130. Hornsey S., Howard A., Ann. N.Y. Acad. Sci., 63, 915 (1956).
131. Pelc S. R., Howard A., Radiation Res., 3, 135 (1955).
132. Lajtha L. G., The Nucleic Acids, Vol. 3, p. 527 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1960).
133. Carter D. B., Holmes B. E., Mee L. K., Acta Radiol. (Stockholm), 46, 655 (1956).
134. Bishop C. W., Davidson J. N., Brit. J. Radiol., 30, 367 (1957).
135. Main R. K., Cole L. J., Ellis M. E., Nature, 180, 1285 (1957).
136. Ord M. G., Stocken L. A., Biochim. Biophys. Acta, 29, 201 (1958).
137. Creasey W. A., Stocken L. A., Biochem. J., 72, 519 (1959).
138. Van Lancker J. L., Fed. Proc., 21, 1118 (1962).
139. Butler J. A. V., Radiation Res., 4, 20 (1956).
140. Opara-Kubinska Z., Lovkiewicz Z., Szybalski W., Biochem. Biophys. Res. Comm., 4, 288 (1961).
141. Zimmermann F., Kroger H., Hagen U., Keck K., Biochim. Biophys. Acta, 87, 160 (1964).
142. Harrington H., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 59 (1964).
143. Bollum F. J., Anderegg J. W., McEly A. B., Potter V. R., Cancer Res., 20, 138 (1960).
144. Main R. K., Cole L. F., Walwick E. R., Nature, 193, 995 (1964).
145. Gold M., Helleiner C. W., Biochim. Biophys. Acta, 80, 193 (1964).
146. Gold M., Helleiner C. W., Percy M., Biochim. Biophys. Acta, 80, 204 (1964).
147. Schildkraut C. L., Richardson C. C., Kornberg A., J. Mol. Biol., 9, 24 (1964).
148. Richardson C. C., et. al., J. Mol. Biol., 9, 46 (1964).
149. Kornberg A., Bertsch L., Jackson J. F., Khorna H. G., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 315 (1964).
150. Fong P., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 239 and 641 (1964).
151. Freese E. B., Freese E., Biochemistry, 2, 707 (1963).
152. Baldwin R. L., The Bacteria, Vol. 5, p. 327 (I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, Eds.), New York, Academic Press (1964).
153. Painter R. B., Rasmussen R. E., Nature, 201, 162 (1964).
154. Rasmussen R. E., Painter R. B., Nature, 203, 1360 (1964).
155. Setlow R. B., Carrier W. L., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 226 (1964).
156. Boyce R. P., Howard-Flanders P., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 293 (1964).
157. Pettijohn D., Hanawalt P., J. Mol. Biol., 9, 395 (1964).
158. Szybalski W., Third International Congress on Photobiology (1960).
159. Szybalski W., The Molecular Basis of Neoplasia, p. 147, Univ. Texas Press (1962).
160. Tatum E. L., Bull. N.Y. Acad. Med., 40, 361 (1964).
161. Pauling L., Bull. N.Y. Acad. Med., 40, 334 (1964).
162. Simon E. J., van Praag D., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 1151 (1964).
163. Butler J. A. V., Nature, 199, 68 (1963).
164. Löwdin P. O., Electronic Aspects of Biochemistry, p. 167 (B. Pullman, Ed.), New York, Academic Press (1964).
165. Byrd C., et. al., Proc. Nat. Acad. Sci., 53, 79 (1965).
166. Crick F. H. C., Proc. 6th Internat. Cong. Biochem., 33, 109 (1964).
167. Chargaff E., et. al., Nature, 206, 145 (1965).
168. Hoffmann T. A., Ladik J., Advances in Chemical Physics, Vol. 7, p. 84 (Ed. J. Duchesne), New York, Interscience (1964).
169. Inman R. B., et. al., J. Mol. Biol., 11, 285 (1965).

Пол
любой
1) д
2) с
3) д
4) н
5) д
Пре
нить, к
леотиди

Дава
заканчи
с другим
Введен
конце м
мер —
получит
ственные
Если УМ
полириб
ным ока
включает
ность бу
Если
соединяе
щелочно
будет о
основани
Если же
ного гид
а нукле

ГЛАВА XII

БИОСИНТЕЗ РНК

Типы реакций

Полирибонуклеотиды могут быть образованы в результате любой из пяти типов реакций:

- 1) действия ДНК-зависимой РНК-полимеразы (К. Ф., 2.7.7.6),
- 2) синтеза гомополимеров из рибонуклеозидтрифосфатов,
- 3) действия РНК-зависимой РНК-полимеразы,
- 4) наращивания имеющихся полинуклеотидных цепей,
- 5) действия полинуклеотидфосфорилазы (К. Ф., 2.7.7.8).

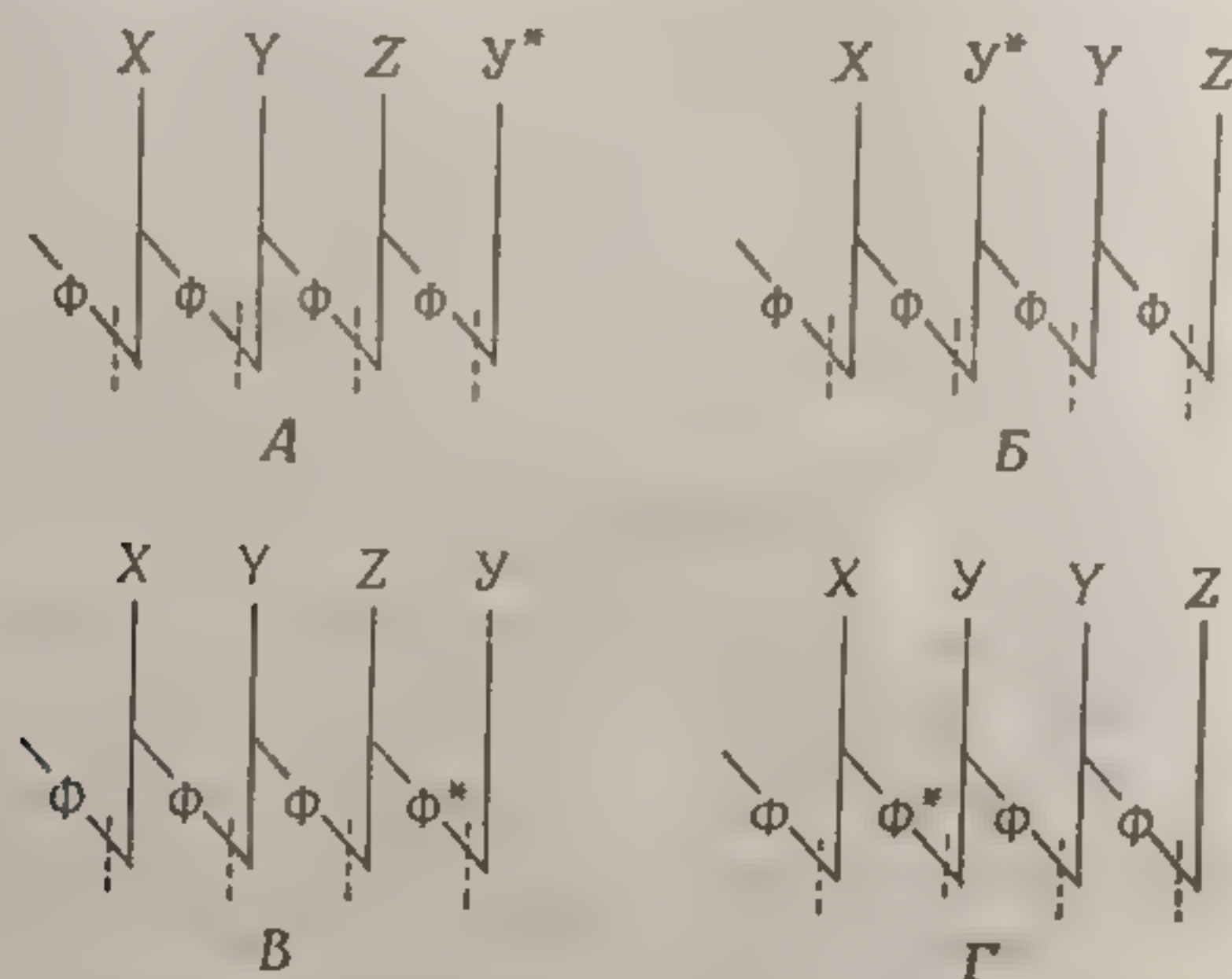
Прежде чем обсуждать различные типы реакций, следует выяснить, как отличить присоединение нуклеотида к концу полинуклеотидной цепи (тип 4) от включения его внутрь молекулы.

Концевое и неконцевое включение нуклеотидов

Давайте предположим, что имеется полинуклеотидная цепь, заканчивающаяся последовательностью $\phi X Y \phi Z$, и что наряду с другими нуклеотидами в нее включается уридин-5'-монофосфат. Введенный в молекулу УМФ может быть расположен либо на конце молекулы — $\phi X \phi Y \phi Z \phi U$, либо где-то внутри нее, например — $\phi X \phi U \phi Y \phi Z$ (фиг. 79). Щелочной гидролиз позволяет затем смесь нуклеозид-3'(2')-монофосфатов и один-единственный нуклеозид, образованный из концевого нуклеотида. Если УМФ был помечен C^{14} по основанию и присоединился к концу полирибонуклеотидной цепи, то после щелочного гидролиза меченым окажется единственный нуклеозид — уридин. Если же УМФ включается в середину молекулы, то при гидролизе радиоактивность будет найдена в уридин-3'(2')-монофосфате.

Если же включающийся УМФ мечен по фосфору (P^{32}) и присоединяется к концу цепи, то, разумеется, выделенный после щелочного гидролиза уридин не будет радиоактивным. Метка будет обнаружена в нуклеозид-3'(2')-монофосфате, содержащем основание Z и занимающем в цепи предпоследнее место (фиг. 79). Если же УМФ включается не с конца молекулы, то после щелочного гидролиза уридин-3'(2')-монофосфат не будет радиоактивным, а нуклеозид-3'(2')-монофосфат, содержащий основание X и рас-

положенный в молекуле рядом с ним, окажется меченым. Логика приведенного рассуждения основана на том предположении (кото-



Фиг. 79. Концевое и пеконцевое включение одной молекулы УМФ в рибонуклеотидную цепь (см. текст).

рое подтверждается и другими доводами), что полинуклеотидная цепь удлиняется с конца, на котором находится нуклеозид с незамещенным С-3' рибозного остатка.

ДНК-зависимый биосинтез РНК (см. обзоры [1—9, 189])

Первые данные о существовании в клетках животных и бактерий фермента, синтезирующего РНК из четырех рибонуклеозидтрифосфатов, появились в 1960—1961 гг. в работах нескольких исследователей [10—15, 167].

Чтобы проиллюстрировать ход реакций, приведем типичные опыты, проведенные Вайсом с экстрактом из ядер клеток печени или *Micrococcus lysodeikticus*, или Гурвицем и Стивенсом с экстрактами из *E. coli*. Если инкубировать неочищенный клеточный экстракт со всеми четырьмя рибонуклеозидтрифосфатами, один из которых помечен C^{14} или P^{32} по α -фосфату, то метка включается в кислотонерастворимый недиаализуемый материал. По своим физическим, химическим и ферментным свойствам он ведет себя как РНК. Он не разлагается ДНК-азой, но гидролизует РНК-азой, диэстеразой змеиного яда и щелочью. При щелочном гидролизе обнаруживаются все четыре предполагаемых рибонуклеотида; при этом оказывается, что меченые нуклеотиды были присоединены не к концу, а внутрь молекулы РНК.

Если в реакционной смеси отсутствует любой из трех немеченых трифосфатов, то тогда и включение меченого трифосфата значительно ослабляется. Оптимальное включение происходит

только в п
трифосфатов
зидтрифосф
Ниже п
ферментного

Полная
Без А
Без У
Без Г
Без Ц
Без Д
С доб
С доб

Полная
состояла и
MnCl₂, сие
мального
или марга
ляется ор
Предва
та с небо
активности
станавлив
состав обр
в качестве

Напри
бонуклеи
ний (поли
из *E. coli*
ДНК из
(табл. 19)
вому в ис
естве затр
использо
зующийс
Если же
для синт
[19, 20],
мер с че
Из во
ляет не
дователь
результ
уже пи

только в присутствии всех четырех трифосфатов. При замене трифосфатов на соответствующие дифосфаты и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты образования РНК практически не наблюдается.

Ниже показано включение в РНК P^{32} -ЦМФ в присутствии ферментного препарата из *Micrococcus lysodeikticus* [74]:

Реакционная смесь	Включение P^{32} -ЦМФ, ммк моль
Полная	10,3
Без АТФ	< 0,2
Без УТФ	< 0,2
Без ГТФ	0,5
Без Mn^{2+}	< 0,1
Без ДНК	< 0,1
С добавлением РНК-азы	0,4
С добавлением ДНК-азы	0,2

Полная реакционная смесь, использованная в этом опыте, состояла из АТФ, УТФ, ГТФ, P^{32} -ЦТФ, трис-буфера с pH 7,5, $MnCl_2$, спермидинфосфата, ДНК-затравки и фермента. Для нормального протекания реакции необходимо наличие ионов магния или марганца. Реакция тормозится пирофосфатом, но не подавляется ортофосфатом.

Предварительная инкубация неочищенного клеточного экстракта с небольшим количеством ДНК-азы полностью снимает его активность, но при добавлении ДНК активность экстракта восстанавливается [10]. Несколькими путями удалось показать, что состав образуемой РНК определяется природой ДНК, внесенной в качестве затравки.

Например, в качестве затравки были использованы дезоксирибонуклеиновые кислоты с очень разнообразным составом оснований (поли-дТ, поли д(А—Т), ДНК фага Т2, ДНК из зубной железы, из *E. coli*, из микрококков, одноцепочечная и двухцепочечная ДНК из фага ϕ X174). Оказалось, что соотношение оснований (табл. 19) в образовавшейся РНК полностью соответствует такому в использованной ДНК-затравке [16—18]. Так, если в качестве затравки был взят полимер поли-Т, из реакционной смеси использовался только один трифосфат, а именно АТФ [1], и образующийся продукт (фиг. 80) представлял собой гибрид (дТ) : (рА). Если же в качестве затравки использовали д(А—Т)-полимер, то для синтеза рибополинуклеотида были нужны только АТФ и УТФ [19, 20], а возникающий полимер представлял собой (У—А)-полимер с чередующимися остатками АМФ и УМФ (фиг. 80).

Из всех этих данных вытекает, что затравочная ДНК определяет не только суммарный состав образующейся РНК, но и последовательность оснований в ней. Этот вывод подтверждается также результатами анализа ближайших соседей [21, 22], о котором мы уже писали (стр. 204). Проиллюстрируем его следующим приме-

Таблица 19

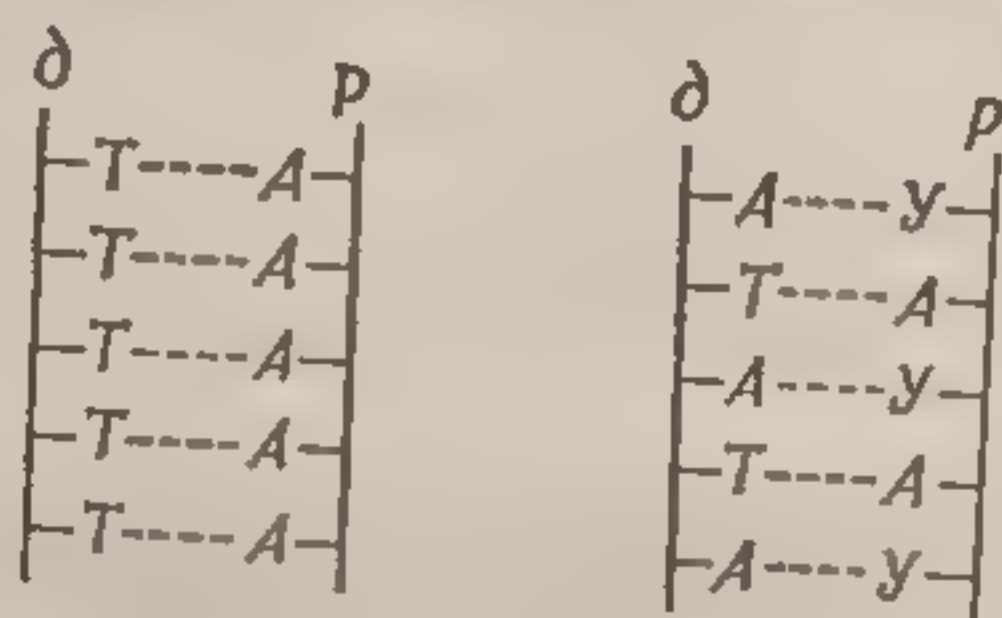
Влияние различных препаратов ДНК на состав образующейся РНК [19]

Добавленная ДНК	$\frac{A + T *}{C + G}$	Содержание в полученной РНК, моль				
		АМФ	УМФ	ГМФ	ЦМФ	$\frac{A + U **}{C + G}$
ДНК фага T2	1,86	0,31	0,34	0,18	0,17	1,85
ДНК из зобной железы	1,35	0,29	0,31	0,19	0,21	1,52
ДНК из <i>E. coli</i>	1,00	0,24	0,24	0,26	0,26	0,93
ДНК из микрококков	0,40	0,17	0,16	0,33	0,34	0,48
ДНК из <i>P. aeruginosa</i>	0,49	0,18	0,16	0,33	0,33	0,51
Поли-Т	—	0,99	0,01	—	—	—
Поли-д(А—Т)	500	0,53	0,48	—	—	—

* Литературные данные.

** Экспериментальные данные.

ром. Возьмем систему, состоящую из полимеразы, ДНК-затравки и четырех трифосфатов, один из которых, например АТФ, помечен



Фиг. 80. Образование рибополинуклеотидных тяжей (p) на дезоксирибо-
полинуклеотидных затравках (d).
Слева показан случай, когда роль затравки выполняет поли-дТ; справа —
роль затравки выполняет поли-д(А—Т).

по внутреннему фосфату (фиг. 81). Образовавшуюся РНК гидролизуют щелочью таким образом, что P^{32} остается прикрепленным к нуклеозиду, соседнему с АТФ. Этот нуклеозид может, разумеется, содержать любое из четырех оснований. Отделяют тогда все четыре меченых рибонуклеозид-3'(2')-монофосфата и измеряют их радиоактивность, чтобы определить, как часто оказывается адениннуклеотид соседом данного нуклеотида в молекуле РНК. Всю операцию повторяют с каждым из остальных меченых трифосфатов в отдельности и таким образом выясняют частоту всех возможных шестнадцати пар ближайших соседей.

При сравнении полученных величин с соответствующими данными для ДНК-затравки [23] между ними обнаружено прекрасное

соответствие (табл. 20). Следовательно, синтезируемая РНК является копией с матрицы ДНК.

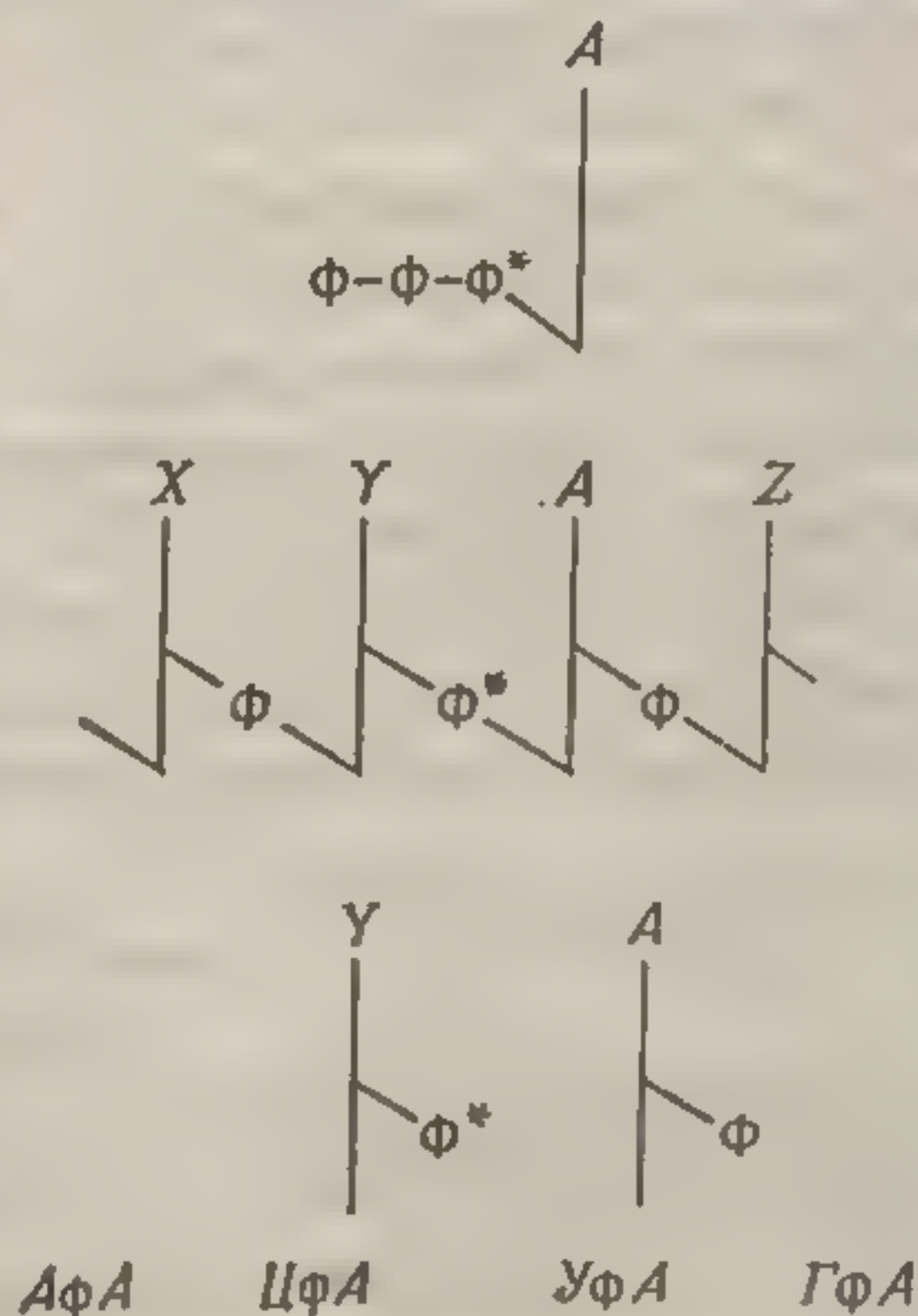
Таблица 20

Частота ближайшего соседствования в ДНК-затравке из зубной железы телят и в образовавшейся РНК [21]

Пары ближайших соседей		ДНК-затравка *		Образовавшаяся РНК	
АфА	АфГ	0,089	0,072	0,088	0,066
ЦфА	ЦфГ	0,080	0,016	0,077	0,021
ГфА	ГфГ	0,064	0,050	0,062	0,049
УфА	УфГ	0,053	0,073	0,050	0,077
АфУ	АфЦ	0,073	0,052	0,076	0,048
ЦфУ	ЦфЦ	0,067	0,054	0,070	0,050
ГфУ	ГфЦ	0,056	0,044	0,058	0,044
УфУ	УфЦ	0,087	0,067	0,087	0,076

* В этой колонке данные, соответствующие У, относятся к Т (в ДНК вместо У присутствует Т).

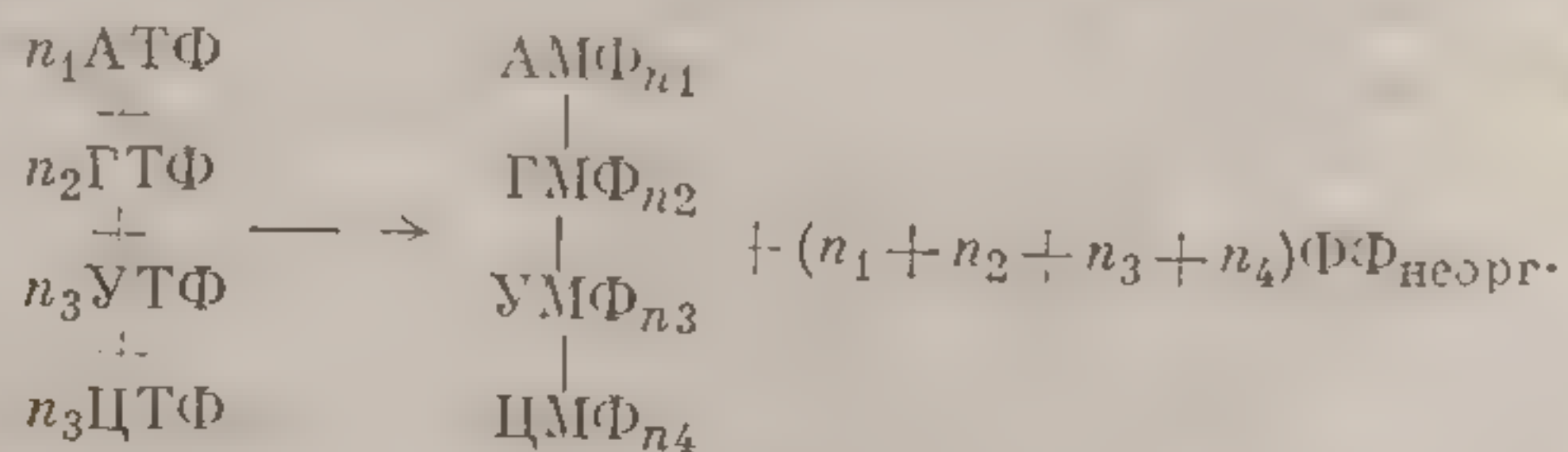
Чтобы продемонстрировать, что цепь РНК, образуемая ДНК-зависимой полимеразой, фактически комплементарна ДНК-затравке, можно воспользоваться также методом *гибридизации*. Он был разработан Холлом и Спигелманом [24, 25]. Мы продемонстрируем его на примере, взятом из опытов, проведенных в 1961 г. Гейдушеком и др. [26]. Используя в качестве затравки ДНК из бактериофага Т2, синтезировали РНК, меченную по фосфору, и выделили ее центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия. К ней добавили ДНК из фага Т2. Затем смесь нагревали в течение 10 мин до 100°, чтобы вызвать разделение двух цепей ДНК. Потом ее медленно охлаждали и оставили при 40° на 12 час. Об образовании гибрида в ходе «отжига» говорили результаты центрифугирования в градиенте плотности. Была получена всего одна полоса; этот факт подтверждается как данными оптических измерений, так и измерениями радиоактивности. В контроле на холоде (12 час при 0°) была обнаружена только



полоса ДНК, не содержащая метки. Если были использованы другие ДНК, а не ДНК фага Т2, то никаких гибридов ДНК с РНК не получалось. Эта способность ДНК-затравки из фага Т2 образовывать специфический комплекс с РНК фага Т2 доказывает существование полного соответствия между нуклеотидной последовательностью в ДНК и РНК фага Т2, что и позволяет им соединяться друг с другом в одно целое. Гибрид этот относительно устойчив к действию РНК-азы. В описанных условиях опыта при образовании гибридного комплекса исключается ренатурация ДНК, о чем свидетельствует, например, отсутствие какой-либо полосы с плотностью, характерной для двухцепочечной ДНК. Это говорит о том, что каждая цепь использованной ДНК может образовывать гибридный комплекс, а следовательно, произошло образование молекул РНК, комплементарных обеим цепям ДНК фага Т2. Следовательно, обе цепи ДНК могут действовать как матрицы или порознь, или вместе (см. ниже).

Удобным средством для обнаружения гибридизации являются нитроцеллюлозные фильтры [177], пропускающие свободную РНК (стр. 64), но задерживающие гибриды РНК с денатурированной ДНК.

Образование специфических гибридов можно использовать для выделения комплементарной РНК при хроматографировании на колонках, состоящих из ДНК, закрепленной на целлюлозе или на агаре (стр. 34). На таких колонках улавливается РНК, специфичная к ДНК, а остальные формы РНК проходят через колонку, не задерживаясь [27—30, 175]. Таким же путем можно сравнивать различные РНК, предоставляя им образовывать гибриды и конкурировать за ДНК [217, 218]. ДНК-зависимая РНК-полимераза, или транскриптаза [31], осуществляющая образование комплементарной РНК на ДНК-матрице (иногда такую РНК называют Д-РНК), в настоящее время выделена из нескольких бактерий и хорошо очищена [32—37]. Она катализирует реакцию, которую мы условно можем изобразить так:



Для этой реакции необходимы ионы марганца, а не магния. Она тормозится пирофосфатом. ДНК-затравка действует каталитически и дает выход РНК, в 60 раз превышающий количество внесенной ДНК. Реакция ингибируется низкими концентрациями актиномицина D [38—41], способного ингибировать и ДНК-поли-

меразу, но при более высоких концентрациях (стр. 220). Актиномицин D действует, связываясь с ДНК, особенно с его гуаниновыми остатками. Поэтому актиномицин D не блокирует РНК-полимеразы, если в качестве затравки используется д(А—Т)-полимер [38]. Профлавин же (стр. 221) подавляет синтез РНК и на д(А—Т)-полимере, и на (дГ) : (дЦ)-полимере [41].

Под действием ДНК-зависимой РНК-полимеразы помимо самих пуринов и пиримидинов в РНК могут включаться также и аналоги этих оснований [168]. Например, псевдоуридинмонофосфат (ψУМФ), риботимидинфосфат, 5-фтороуридинмонофосфат и 5-бромуридинмонофосфат могут легко заменять УМФ из соответствующих трифосфатов; 6-азагуанозинфосфат и ИМФ специфически замещают ГМФ.

Образование РНК на цепях ДНК можно с успехом продемонстрировать на гигантских хромосомах спящих желез личинок *Chironomus*. Некоторые участки этих хромосом могут очень сильно увеличиваться в размерах, образуя так называемые пuffs. При помощи радиоавтографии на них легко проследить образование РНК из предшественника — уридина, меченого тритием [180]. Исследование методом микроэлектрофореза дает возможность определять нуклеотидный состав РНК и ДНК (стр. 31); полученные результаты свидетельствуют о том, что образованная РНК представляет собой копию лишь одной цепи ДНК [181]. Эта РНК, по-видимому, служит посредником в процессах передачи генетической информации (стр. 240) [205].

Короткие тимидинполинуклеотиды, синтезированные химическим путем (стр. 81), могут служить матрицами для синтеза аденинполирибонуклеотидов (поли-рА) под действием РНК-полимеразы [182]. Интенсивность матричной активности зависит от длины использованного полинуклеотида. Вполне измеримую активность можно обнаружить для тимидинового пептануклеотида; максимальная же активность достигается в присутствии тетрадекануклеотида. Образующийся продукт представляет собой цепь из 50—100 нуклеотидов в среднем. Синтез поли-рГ происходит только в том случае, если используемый как матрица полинуклеотид содержит более восьми дЦ-нуклеотидов.

Если взять в качестве затравки синтетический нонануклеотид д-(ТТЦ)₃, то образуется комплементарный рибополинуклеотид, содержащий около 200 нуклеотидов, с повторяющейся последовательностью ААГ [219].

Короткие олигорибонуклеотиды могут инициировать синтез РНК с помощью РНК-полимеразы в присутствии ДНК-затравки. Так, например, тетрарибонуклеотид, содержащий 4 остатка аденина, стимулирует биосинтез поли-рА на поли-дТ в качестве затравки [81].

Матричная активность ДНК при синтезе РНК резко снижается, если часть молекулы оказывается заблокированной гистонами (стр. 286). Существует гипотеза о том, что с помощью различных модификаций в структуре гистонов (например, с помощью их метилирования или ацетилирования) можно воздействовать на их способность ингибировать синтез РНК *in vivo* и тем самым регулировать синтез РНК в клетке [185].

Копируется одна или обе цепи ДНК?

Известно, что нативная (двухцепочечная) ДНК является гораздо более эффективной затравкой для полимеразной реакции, чем денатурированная (одноцепочечная) ДНК [21]. Значит ли это, что в процессе полимеразной реакции копируются обе цепи нативной ДНК? По мнению Вайсса [3], если копированию подвергаются обе цепи ДНК, то две образующиеся цепи РНК должны быть взаимно комплементарны и могут взаимодействовать друг с другом, образуя двухцепочечную структуру. Именно это и наблюдается в действительности.

Прямые доказательства в пользу считывания с обеих цепей ДНК были получены с помощью (дГ) : (дЦ)-сополимера, в котором одна цепь (поли-дГ) связана водородными связями со второй цепью (поли-дЦ) (стр. 214). Показано, что при использовании

Таблица 21
Сравнение матричной активности одноцепочечной и двухцепочечной ДНК из фага $\phi X174$ в РНК-полимеразной реакции [5, 21]

ДНК-затравка	Включение рибонуклеотидов за 20 мин, ммоль			
	АМФ	УМФ	ЦМФ	ГМФ
Одноцепочечная ДНК фага $\phi X174$				
Экспериментальные данные	1,02	0,79	0,72	0,62
Теоретические вели- чины *	1,02	0,77	0,70	0,58
Двухцепочечная ДНК фага $\phi X174$				
Экспериментальные данные	1,16	1,10	0,87	0,86
Теоретические вели- чины *	1,16	1,16	0,84	0,84

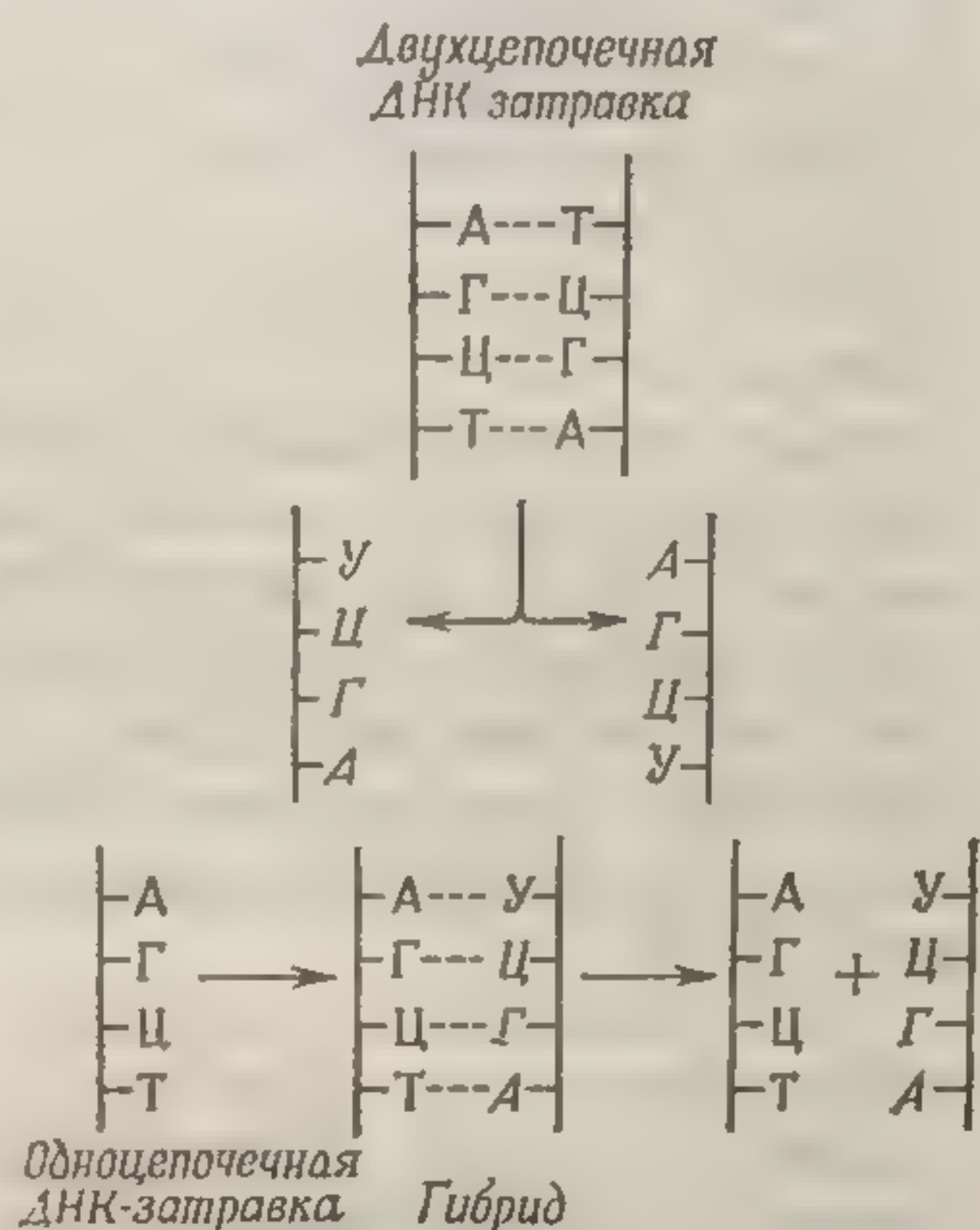
* Теоретические величины для РНК, комплементарной ДНК, вычислены на основании известного состава ДНК фага $\phi X174$.

в качестве затравки такого сополимера в образующийся рибонуклеотид включаются и ГМФ, и ЦМФ [32]. Еще более веские доказательства были получены в опытах, в которых в качестве затравки использовали одноцепочечную ДНК из бактериофага $\phi X174$ (стр. 160) и двухцепочечную ДНК из этого фага, полученную *in vitro* с помощью ДНК-полимеразы (стр. 214). Как видно из полученных результатов (табл. 21), одноцепочечная ДНК дает РНК, состав которой комплементарен по составу этой ДНК; при использовании же двухцепочечной ДНК состав образованной РНК говорит о том, что считываются обе цепи ДНК [21, 32].

Когда затравкой служит одноцепочечная ДНК, вначале образуется гибрид ДНК с РНК. Только после того, как количество связанной в гибриде РНК становится равным количеству ДНК-затравки (своего рода критическая точка), можно наблюдать появление свободной РНК [44, 176, 214]. Если же в качестве затравки используется двухцепочечная ДНК фага $\phi X174$ (фиг. 82), продуцируется свободная РНК, а двойная спираль ДНК сохраняется нетронутой [42—44].

Таким образом, *in vitro* в опытах с очищенной РНК-полимеразой копируются обе цепи ДНК. Однако *in vivo* дело, по-видимому, обстоит иначе. На основании генетических данных с *rII*-мутантами фага T4 [45] и опытов с отдельными цепями ДНК из *D. pneumoniae* [46] можно полагать, что *in vivo* считывается только одна цепь ДНК. Веские доводы в пользу того, что *in vivo* только одна цепь ДНК транскрибируется в РНК, были получены в результате биохимического анализа бактерий, зараженных бактериофагами α , SP8 и $\phi X174$.

У бактериофагов α и SP8 две цепи ДНК настолько различаются по плотности, что в градиенте плотности хлористого цезия или на колонке с метилированным сывороточным альбумином их можно разделить на тяжелую и легкую цепи ДНК. В опытах *in vitro* обе цепи могут служить затравкой для РНК-полимеразной реакции. Однако если из зараженной фагом бактериальной клетки выделить РНК, синтезированную *in vivo*, то такая РНК образует



Фиг. 82. Биосинтез РНК на двухцепочечной ДНК-затравке (вверху) и на одноцепочечной ДНК-затравке (внизу).

гибрид, устойчивый к действию рибонуклеазы, только с тяжелой цепью ДНК [47—49]. В пользу того, что *in vivo* транскрибируется только одна из двух цепей ДНК, говорят также следующие наблюдения: в РНК, образованной после заражения клетки бактериофагом Т4, количество А не равно количеству У, а количество Ц не равно количеству Г [50].

Аналогичные исследования были проведены на клетках, зараженных бактериофагом ϕ X174. Так, например, одноцепочечная ДНК, изолированная из фага ϕ X174, практически не образует гибрида с комплементарной РНК, образовавшейся *in vivo* в зараженных клетках. Эта РНК, однако, может быть гибридизирована с денатурированной ДНК, образующейся после нагревания двухцепочечной репликативной формы фага ϕ X174 (стр. 214). По-видимому, гибрид образуется не с исходной «зрелой» цепью ДНК, а со второй цепью репликативной формы ДНК [51, 52]. Эта вторая цепь репликативной формы служит, по-видимому, источником передаваемой генетической информации. Вместе с тем в условиях *in vitro* в качестве матрицы, по-видимому, используются обе цепи ДНК [52].

Этот кажущийся парадокс был объяснен Спигелманом [53], установившим, что в опытах *in vitro* обычно используют фрагментированную ДНК. Он показал, что если препарат репликативной формы ДНК из фага ϕ X174 очистить очень аккуратно, то он окажется состоящим из целых двухцепочечных колец. Если затем для синтеза РНК использовать такие неповрежденные кольца, образовавшаяся РНК оказывается комплементарной только одной цепи, а именно той, которая комплементарна исходной, «зрелой», цепи двухцепочечной формы. Если же РНК получают с помощью ДНК, находящейся в виде разорванных на части колец, то цепи РНК оказываются комплементарными обоим цепям ДНК. Такой механизм подбора цепей, видимо, является уникальной особенностью кольцевой двухцепочечной ДНК.

Но если *in vivo* копируется только одна цепь ДНК, то напрашивается вопрос, в чем же заключается функция другой цепи [54, 209]. Копирование только одной цепи отнюдь не означает, что вторая цепь ДНК неактивна. Так, было показано, что РНК, синтезированная РНК-полимеразой в присутствии нативной (двухцепочечной) ДНК, может стимулировать включение аминокислот в бесклеточной, белоксинтезирующей системе [55]. РНК же, образованная на денатурированной или одноцепочечной ДНК, либо совсем не стимулирует включения аминокислот, либо стимуляция эта незначительна. Если такую одноцепочечную форму ДНК превратить в двухцепочечную с помощью ДНК-полимеразы или же путем ренатурации денатурированной ДНК, то на ней будет формироваться активная РНК. Следовательно, для образо-

вания биологически активной РНК необходима двойная спиральная структура ДНК.

Вопрос еще больше усложнился после установления следующего факта: неочищенная надосадочная фракция гомогената из *B. megatherium* стимулирует ограниченный и асимметричный ДНК-зависимый синтез РНК *in vitro* [207]. Если при этом в качестве матрицы использовать ДНК из фага α , то считается только тяжелая цепь ДНК, подобно тому как это наблюдается *in vivo*.

Действие гормонов

У крыс после удаления щитовидной железы снижается активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы в ядрах клеток печени. При введении гормонов щитовидной железы она может сильно возрасти [56]. Синтез комплементарной РНК в интактном организме животных стимулируется ростовым гормоном [57, 206], гидрокортизоном [58], кортизолом [59] и эстрадиолом [60, 174]. Гормон линьки насекомых, экдизон, усиливает образование комплементарной РНК [205].

Биосинтез рибосомной РНК

Поскольку нуклеотидный состав рибосомной РНК не коррелирует с нуклеотидным составом ДНК в тех же клетках, казалось сомнительным, чтобы и рибосомная РНК действительно образовывалась на ДНК-матрице. Однако, как показали Яновский и Спингелман [61—64] методом гибридизации, рибосомная РНК представляет собой продукт транскрипции лишь небольшой части ДНК бактериальной клетки [61—64]. Яновский и Спингелман выбрали организмы, ДНК которых резко отличается по составу от рибосомной РНК, поместили их РНК с помощью P^{32} или H^3 и позволили затем клеткам находиться на нерадиоактивной среде еще некоторое время. За этот период метка исчезала из быстро метящейся *m*-РНК и накапливалась в стабильной *r*-РНК. Затем дали возможность образоваться гибридам, после чего удалили РНК-азой всю негибридизованную РНК и выделили устойчивые к РНК-азе гибриды. Оказалось, что только менее 0,4% всей ДНК комплементарно РНК из 16S- и 23S-рибосом. Нерибосомная РНК из данного организма не конкурирует за эту фракцию ДНК. Более того, сами *r*-РНК из 16S- и 23S-рибосом берут начало от различных участков ДНК. Это предположение основано на следующих фактах: во-первых, максимальное количество РНК, способное образовать гибрид с ДНК, различно для этих двух РНК. Во-вторых, когда *r*-РНК из 16S- и 23S-рибосом присутствуют одновременно в насыщающих концентрациях, то образование гиб-

рида носит аддитивный характер. В-третьих, нет никаких данных о том, что эти две формы *r*-РНК конкурируют между собой за одни и те же участки ДНК.

Подобные же данные были получены и в опытах с клетками млекопитающих [65].

Аналог морфина, леворфанол (стр. 220), избирательно подавляет биосинтез *r*-РНК у *E. coli*, не действуя на синтез *m*-РНК или *s*-РНК [208].

5,6-дихлор-1- β -D-рибофуранозил-бензимидазол также применяется как ингибитор синтеза РНК, особенно РНК вирусов [212].

Биосинтез *s*-РНК

С помощью метода гибридизации было показано также, что очень небольшая доля (примерно 0,025%) клеточной ДНК составляет участок, комплементарный по порядку оснований *s*-РНК [64, 66—68]. Высокое содержание метилированных оснований в *s*-РНК является, по-видимому, следствием метилирования уже на полинуклеотидном уровне [69—73].

Образование гомополимера

РНК-полимераза катализирует также образование гомополимеров [74, 75]. Например, в присутствии ДНК-затравки, пионофосфат. Поли-У и поли-Ц образуются в меньших количествах, а образование поли-Г едва удается уловить. ДНК, денатурированная нагреванием, гораздо эффективнее в качестве затравки для синтеза гомополимеров, чем нативная ДНК. Реакция тормозится полиаминами и добавлением (более чем одного) нуклеотидов.

Информационная РНК (*m*-РНК)

Открытие ДНК-зависимой РНК-полимеразы совпало во времени с возникновением концепции о существовании информационной РНК, условно обозначаемой *m*-РНК. В то время как существование РНК-полимеразы было установлено в опытах *in vitro* с бесклеточными системами, гипотеза об *m*-РНК основывалась на результатах изучения *in vivo* бактериальных клеток, зараженных и незараженных бактериофагом. Информационная РНК представляет собой комплементарную форму РНК (или Д-РНК), образующуюся под влиянием ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Ей посвящены многочисленные обзоры [9, 76—86].

Первоначальное наблюдение, положившее начало гипотезе о существовании особой РНК, несущей функцию некого посредни-

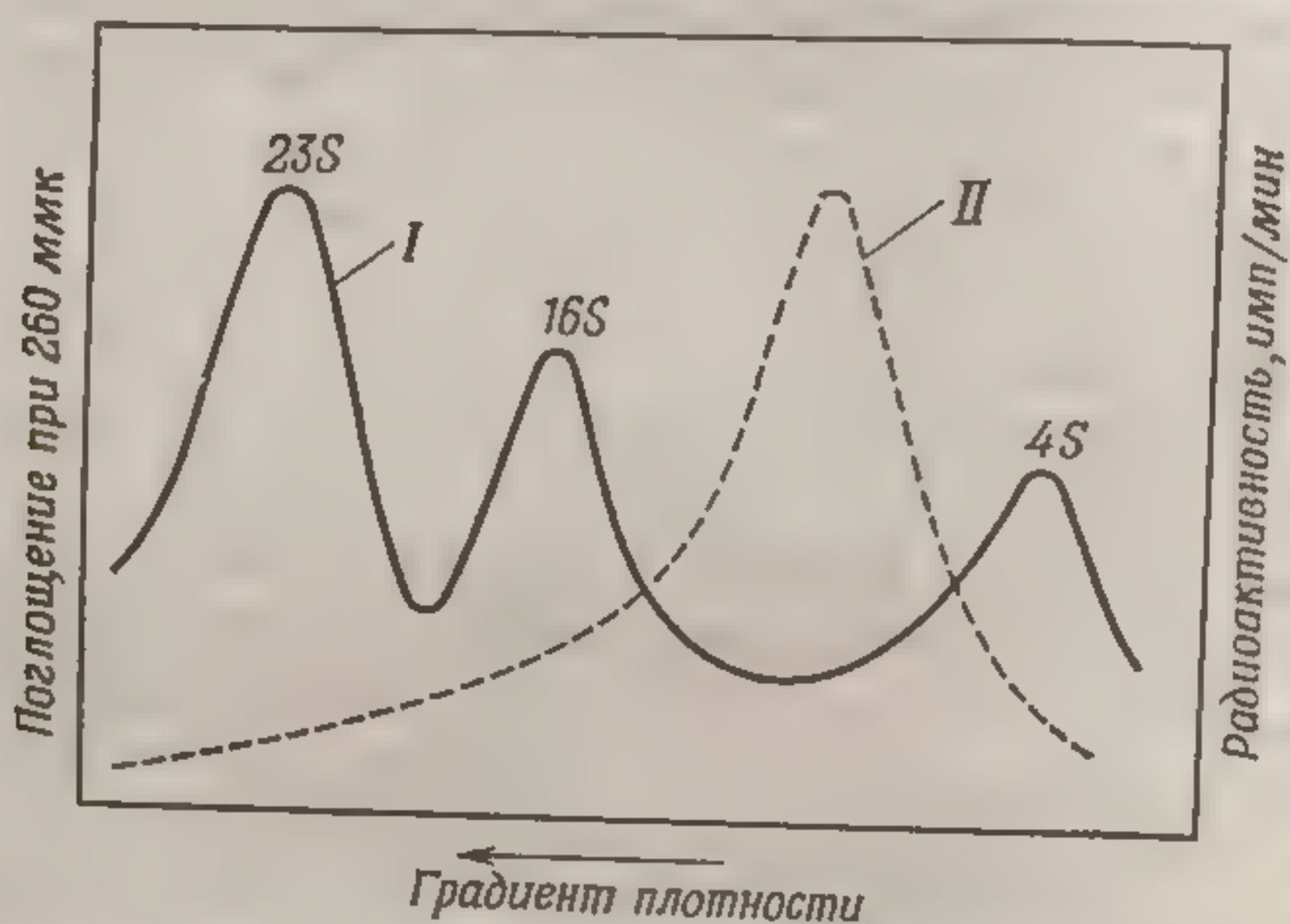
ка в передаче генетической информации, было сделано в 1953 г. [87], когда было обнаружено, что в клетках *E. coli*, зараженных фагом T2, происходит быстрое образование новых молекул РНК. В 1956 г. был поставлен специальный опыт, в котором эту РНК метили P^{32} и после щелочного гидролиза изучали распределение метки в мононуклеотидах. Полученные результаты показали, что быстрометящаяся РНК отличается по составу от РНК *E. coli* и напоминает ДНК фага T2 [88, 89]. Это позволяло считать, что быстрометящаяся РНК образуется на ДНК-матрице. Особенно важно учесть, что относительный нуклеотидный состав этой РНК определялся по радиоактивности нуклеотидов, полученных после щелочного гидролиза. Поэтому полученные результаты можно считать достоверными только в том случае, если действительно все четыре нуклеотида метятся в равной степени или если последовательность нуклеотидов в цепи нуклеиновых кислот является случайной [90].

Физические свойства *m*-РНК были изучены Спигелманом и его сотрудниками [24, 90—92]. Они показали, что *m*-РНК образует специфический комплекс с ДНК фага T2, и пришли к выводу о том, что быстрометящаяся РНК, возникающая после заражения, представляет собой T2-специфичную РНК, которая по нуклеотидному составу комплементарна ДНК этого фага. Приблизительно в это же время Жакоб и Моно [82, 83, 93] установили, что РНК, синтезируемая после заражения фагом, прикрепляется затем к существовавшим ранее рибосомам бактериальной клетки. Ее можно отделить от них, если понизить концентрацию магния при центрифугировании в градиенте хлористого цезия. Рибосомы, с которыми связывается *m*-РНК, образуются в клетке задолго до заражения. Это было доказано специальными опытами, в которых клетки *E. coli* метили изотопами C^{13} и N^{15} ; затем эти «тяжелые» клетки переносили в «легкую» среду, содержащую C^{12} и N^{14} , и заражали фагом T2. Оказалось, что T2-специфичная РНК при соединялась к «тяжелым», т. е. «старым» рибосомам. Одновременно при помощи импульсной метки радиоактивной кислотой было показано, что вновь синтезируемый T2-специфичный белок также образуется на «тяжелых рибосомах». Следовательно, T2-специфичная РНК действовала в качестве посредника, доставившего информацию от ДНК фага T2 к рибосомам, и в них «руководила» образованием фаговых белков.

Существование такой нестабильной РНК в нормальных (незараженных) клетках бактерий вскоре было продемонстрировано в ряде лабораторий [94, 95]. Особенно отчетливо ее можно показать в опытах с медленно развивающимися (step-down) культурами, в которых клетки пересаживают с полной питательной среды, благоприятной для быстрого роста, на среду бедную. В этих

условиях клетки содержат больше рибосом, чем они могут использовать, поэтому синтез рибосомной РНК останавливается. Синтез белка, однако, при этом продолжается, хотя и медленно, а это значит, что в такой «замедленной» культуре должен, по-видимому, протекать и некоторый синтез *m*-РНК.

На фиг. 83 показан ход постановки опыта. Бактериальные клетки получали импульсную метку, т. е. их помещали на несколько секунд в среду, содержащую такие предшественники РНК,



Фиг. 83. Разделение различных клеточных РНК центрифугированием в градиенте плотности CsCl . По правой оси ординат отложена радиоактивность после импульсной метки (см. текст). I — поглощение при 260 мкм; II — радиоактивность после импульсной метки.

как $\text{P}^{32}\text{O}_4^{3-}$ или C^{14} -уридин. Затем часть клеток отбирали и центрифугированием в градиенте плотности изучали входящую в их состав РНК. Остальную часть культуры отмывали от метки и переносили на полчаса в среду, не содержащую изотопов, чтобы таким путем проследить судьбу меченых соединений на следующей стадии их обмена.

После импульсной метки и центрифугирования в градиенте плотности были получены, как и предполагалось, три пика, поглощающие ультрафиолет при 260 мкм. Пики эти соответствовали 23S- и 16S-рибосомам и 4S-с-РНК и не содержали метки. Пик радиоактивности соответствует фракции, содержащей молекулы с коэффициентом седиментации между 4S и 16S (фиг. 83). Однако количество вещества в этой фракции слишком мало, чтобы его можно было определять путем измерения оптической плотности; этот пик соответствует *m*-РНК.

С помощью градиентного центрифугирования РНК, выделенной из клетки после периода вытеснения метки, удалось показать,

что для *m*-РНК
При этом п
появлялась
Изучени
быстромет
составу эта
образовать
[79, 95]. Е
ствующую
те плотност

При сп
связываетс
мы, котор
рибосомы
нить *m*-Р
рассмотр
m-РНК и
В бакте
участии Д
тез *m*-РНК
от всей Р
[79, 175, 1
нет единог
ляет при
гать, что
гетерогенн
Продол
но, что она
[98—100].

что для *m*-РНК характерна небольшая продолжительность жизни. При этом пик радиоактивной *m*-РНК исчезал, а радиоактивность появлялась в остальных трех пиках (стр. 245).

Изучение радиоактивности нуклеотидов, входящих в состав быстрометящейся РНК, показало, что по своему нуклеотидному составу эта РНК соответствует ДНК (табл. 22); *m*-РНК может образовать гибриды с ДНК тех клеток, в которых она возникает [79, 95]. Ее можно выделить на колонках, содержащих соответствующую ДНК [27, 28], или путем центрифугирования в градиенте плотности.

Таблица 22
Молярные соотношения оснований в нуклеиновых кислотах *Escherichia coli* [79]

Нормальные клетки	А	Ц	Г	У (Т)
ДНК	24—25	25—26	25—26	24—25
r-РНК	25,2	26,1	31,5	21,7
m-РНК	25,1	24,1	27,1	23,7
s-РНК	20,3	28,9	32,1	15,0
Клетки, зараженные фагом				
ДНК фага T2	32	17	18	32
m-РНК	31	17	20	31

При специально подобранных концентрациях магния *m*-РНК связывается с 70S- и 10 S-рибосомами, образуя тяжелые рибосомы, которые седиментируют быстрее, чем свободные от *m*-РНК рибосомы [94, 96]. Несколько рибосом могут соединяться с одной нитью *m*-РНК, образуя так называемые полисомы. Полисомы мы рассмотрим несколько позже (стр. 280) при обсуждении роли *m*-РНК и рибосом в синтезе белка.

В бактериальных клетках *m*-РНК образуется, разумеется, при участии ДНК-зависимой РНК-полимеразы, и, следовательно, синтез *m*-РНК ингибируется актиномицином D [97]. Доля *m*-РНК от всей РНК клетки очень невелика и обычно составляет 1—2% [79, 175, 191, 192]. Относительно ее молекулярного веса пока что нет единого мнения. Молекулярный вес *m*-РНК из *E. coli* составляет приблизительно 500 000 [79], хотя есть основания предполагать, что *m*-РНК по своему молекулярному весу чрезвычайно гетерогенна [101].

Продолжительность жизни *m*-РНК в клетке коротка; возможно, что она разлагается под действием полинуклеотидфосфорилазы [98—100]. Для бактериальных клеток, у которых одно поколение

живет в среднем 90 мин, период обновления *m*-РНК составляет всего 4—6 сек [79]. Было рассчитано, что у *B. subtilis* молекула *m*-РНК, период жизни у которой составляет в среднем 2 мин, принимает участие в синтезе белка в среднем 10—20 раз. В клетках млекопитающих *m*-РНК живет, конечно, дольше: 8—12 час в печени крысы [183] и 3—4 час в клетках HeLa [184]. В ретикулоцитах этот период, должно быть, еще длиннее.

Короче говоря, информационная РНК представляет собой метаболически активную, короткоживущую форму комплементарной РНК, образующуюся на ДНК клетки при участии ДНК-зависимой РНК-полимеразы; *m*-РНК переносит информацию от ДНК, т. е. от носителя генетической информации, к рибосомам, с которыми во время белкового синтеза она находится в тесном контакте.

О выделении *m*-РНК на ДНК-агаровых колонках мы уже упоминали (стр. 234).

В то время как существование *m*-РНК в бактериальных клетках давно признано, наличие *m*-РНК в тканях животных все еще ставится под сомнение. Если в клетках животных *m*-РНК образуется, то она, вероятно, продуцируется на ядерной ДНК, затем передвигается в цитоплазму и контролирует синтез белка, протекающий в цитоплазматических рибосомах. Давно уже известно (стр. 141), что быстрометящаяся РНК образуется в клеточном ядре [194—200]. Возможность передвижения целых полинуклеотидов из ядра в цитоплазму ставится под сомнение [102], а многими исследователями даже оспаривается [99, 103—107]. Тем не менее накопилось немало доводов в пользу существования в клетках животных информационной РНК, сходной по своим свойствам с соответствующей РНК из бактерий. В качестве таких доводов можно назвать следующие.

1. В ядерном материале различных клеток млекопитающих была обнаружена быстрометящаяся фракция РНК, которая по молярному соотношению нуклеотидов напоминала ДНК. Эта фракция РНК по скорости обновления и седиментационным свойствам похожа на бактериальную *m*-РНК [30, 108—117].

2. Такая же фракция была обнаружена в цитоплазме [111, 115, 118—120, 178, 179] в тесной связи с микросомами [121] и полисомами [122].

3. Эта фракция стимулирует включение аминокислот [109, 120, 122—124].

4. Она обладает способностью давать гибриды с гомологичной ДНК [125, 126]. Например, клетки асцитной опухоли Кребс II метили в течение 20 мин уридином, меченным тритием, затем экстрагировали всю РНК клетки и центрифугировали в градиенте сахарозы. К тому времени, когда основная масса РНК в клетке почти не успела стать радиоактивной, уже был обнаружен пик быстро-

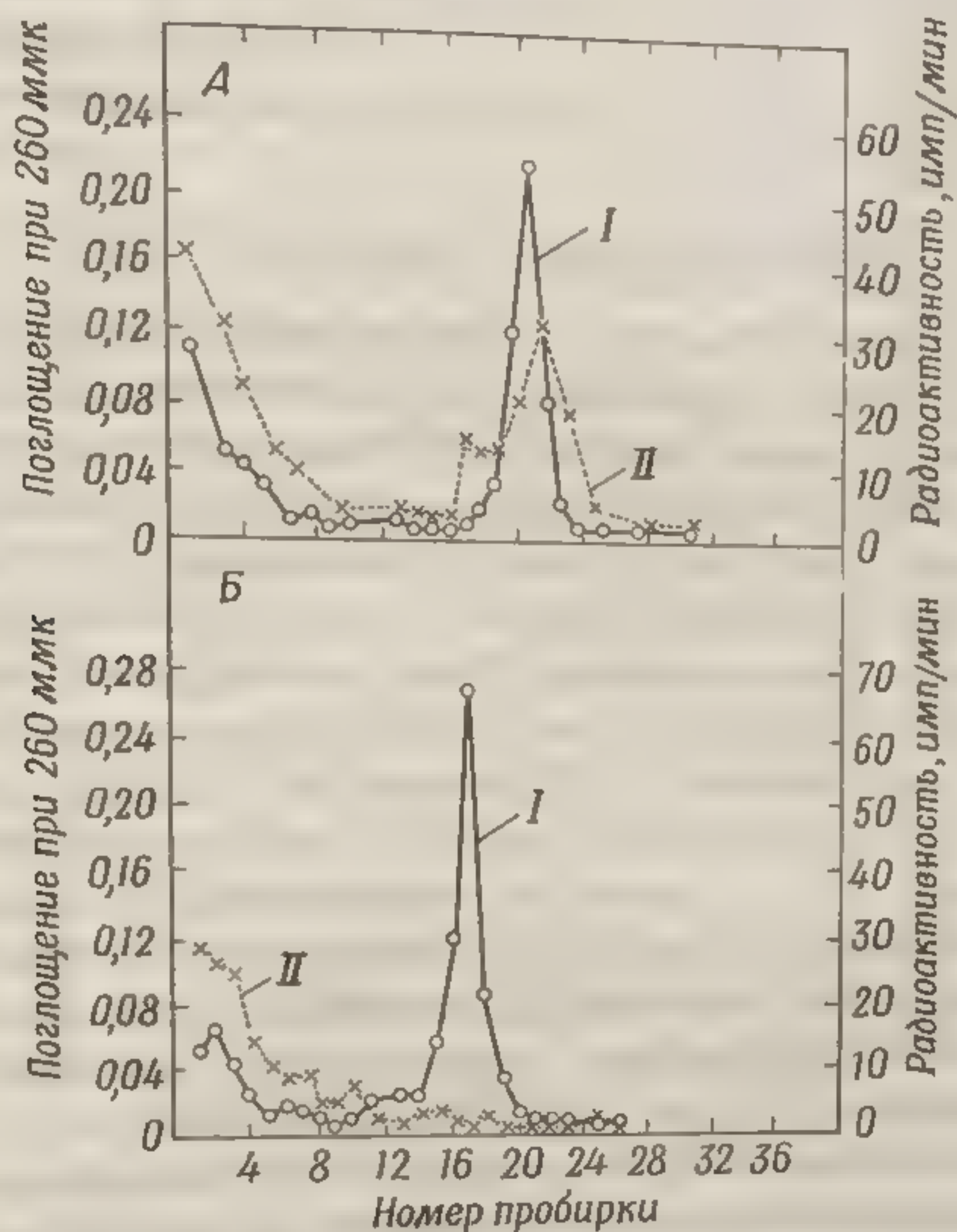
метящейся
При более
трех глав
ческой ил

Фиг. 84. С

После «отж
теленка (В

Фракц
условиях
II, выдер
охлаждал
плотности
ствующая
детельств
ной РНК
далось, е
зобной ж
Таким
ток, в ко

метящейся фракции РНК, содержащей тяжелые (40S) частицы. При более длительной экспозиции метка перераспределялась по трем главным пикам клеточной РНК, различающимся по оптической плотности при 260 мкм [126].



Фиг. 84. Седиментационный анализ в градиенте плотности хлористого цезия [126].

После «отжига» с ДНК из того же источника (А) и с ДНК из зубной железы телят (Б); взята меченная ^3H -уридин ^{40}S -РНК из асцитной опухоли Кребе II [126].

I — оптическая плотность; II — радиоактивность.

Фракцию быстрометящейся РНК обрабатывали в специальных условиях раствором ДНК, выделенной из асцитной опухоли Кребе II, выдерживали в течение 2 час при температуре 57° и медленно охлаждали до $25-30^\circ$. Затем смесь центрифугировали в градиенте плотности хлористого цезия и установили, что полоса, соответствующая по оптической плотности ДНК, радиоактивна. Это свидетельствовало о том, что между цепью ДНК и цепью радиоактивной РНК образовался гибрид. Никакой гибридизации не наблюдалось, если брали какую-либо чужую ДНК, например ДНК из зубной железы телят (фиг. 84).

Таким образом, фракция РНК комплементарна ДНК тех клеток, в которых она образуется. Эти результаты являются одним

из наиболее убедительных доводов в пользу образования *m*-РНК в клетках животных.

В растительных клетках также наблюдали появление фракции *m*-РНК, образование которой связано с ДНК [127] и которая затем может переходить в цитоплазму, соединяясь там с рибосомами [128, 129]. Информационная РНК образуется также на вирусной ДНК в клетках животных, зараженных ДНК-содержащими фагами [130, 131].

РНК-зависимый биосинтез РНК

Вытяжки из некоторых микроорганизмов катализируют синтез РНК в присутствии природных и синтетических РНК-затравок [132—135]. Реакция эта требует наличия не только затравки и фермента, но и двухвалентного катиона, лучше всего марганца, а также комплементарных нуклеозидтрифосфатов. Если, например, в качестве затравки взят поли-У, то продуктом реакции будет полимер поли-А. Актиномицин D не ингибирует этого процесса. Было выдвинуто предположение, что фермент, осуществляющий эту реакцию, идентичен ДНК-зависимой РНК-полимеразе. Оно основано на том, что фермент, выделенный из *Azotobacter vinelandii*, имел такие же показатели седimentации и ингибировался ДНК. Эта гипотеза получила подтверждение в наблюдениях Вайсса с сотрудниками и Стивенса, показавших, что очищенная ДНК-зависимая РНК-полимераза, выделенная из *M. lysodeikticus* и *Escherichia coli*, «признает» РНК-затравку.

С другой стороны, РНК-зависимая РНК-полимераза, выделенная из клеток животных, по своим свойствам значительно отличается от ДНК-зависимого фермента [136]. В опытах с экстрактами из асцитных опухолей Кребс II количество включенного рибонуклеотида увеличивалось линейно по мере возрастания количества затравочной РНК и не зависело от источника использованной затравки [137]. Ферментные препараты этих экстрактов содержат некоторое количество РНК. Если эту эндогенную затравку разрушить рибонуклеазой, которую затем можно удалить с помощью бентонита, то активность изучаемого фермента оказывается сильно ингибированной, в то время как активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы в этих условиях не меняется. Добавление же дезоксирибонуклеазы не действует на РНК-зависимую РНК-полимеразу, но угнетает ДНК-зависимый синтез. Более того, обе ферментные системы отличаются по оптимуму рН и потребности в различных ионах. ДНК-зависимая ферментная система имеет оптимум рН около 7,5; при этом ее действие усиливается добавлением меркаптоэтанола и ионов марганца. РНК-зависимый фермент активнее всего при рН 9,5, но в этих условиях ионы марганца и меркаптоэтанол подавляют его активность.

В опытах с асцитной карциномой Ландшутца было показано, что в микросомной фракции осуществляется РНК-зависимое включение АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ. Эта система не реагирует на ДНК-затравку, не зависит от актиномина D или ДНК-азы, ингибируется РНК-азой и стимулируется в присутствии всех четырех рибонуклеозид-5'-трифосфатов [138].

Хотя приведенные данные подтверждают, но еще не доказывают существования самостоятельной РНК-полимеразы, для которой затравкой служит РНК, наличие РНК-зависимой РНК-полимеразы было отчетливо показано в опытах с клетками, зараженными РНК-содержащим вирусом, в частности на клетках асцитной опухоли Кребс II, зараженных РНК-содержащим вирусом ЕМС [137]. Репликация вирусной РНК может осуществляться несколькими механизмами. Например, вирусная РНК может индуцировать синтез ДНК, которая в свою очередь обеспечит синтез вирусной РНК. Или же возможен прямой синтез РНК на вирусной РНК в качестве матрицы. Чтобы установить, каким же из этих путей осуществляется репликация вирусной РНК в клетках, зараженных вирусом ЕМС, изучали активность трех полимераз: а) ДНК-полимеразы; б) ДНК-зависимой РНК-полимеразы и в) РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Оказалось, что активность ДНК-полимеразы и ДНК-зависимой РНК-полимеразы в зараженных клетках не увеличивается. Вместе с тем в экстрактах из зараженных клеток резко возрастает активность РНК-зависимой РНК-полимеразы. По последним данным это усиление обусловлено вновь синтезированным ферментом, локализованным в зараженной клетке во фракции крупных частиц [215].

Дальнейшие данные были получены с помощью актиномина D [126]. РНК, экстрагированная из асцитных опухолей Кребс II и отцентрифугированная затем в сахарозном градиенте, образует три пика, поглощающих при 256 мμ. При идентификации оказалось, что пики эти соответствуют РНК с константами седиментации 30S, 19S и 4S. Если клетки в течение короткого времени (20 мин) инкубировать с уридином, меченным тритием, то радиоактивность обнаружится только в двух пиках: меньшая — в пике 4S-РНК (растворимая РНК) и большая — в очень небольшом пике 40S-РНК. Обычные клетки и клетки, зараженные вирусом ЕМС, дают аналогичные результаты. При более длительной инкубации (2 час) радиоактивность находят не только в пике 40S-РНК, но и в трех пиках, поглощающих в ультрафиолете. Такая же картина наблюдается в зараженных клетках.

В присутствии актиномина D (10 мкг/мл) был получен иной эффект. Клетки заражали фагом и через 80 мин после заражения в присутствии актиномина D подвергали кратковременной

(20 мин) метке H^3 -уридином. Метка не обнаруживалась ни в одном пике, за исключением пика 4S-РНК. В этом пике была обнаружена слабая радиоактивность, которую можно отнести за счет концевых включений в s-РНК остатков цитидина, возникших из уридина.

Иная картина наблюдается, если клетки обрабатывать меченым уридином через более длительный (4—5 час) срок после заражения. Если в незараженных клетках имеется всего лишь один пик радиоактивности, соответствующий 4S-РНК, то в зараженных, кроме того, обнаруживается радиоактивность в пике 35S-РНК, т. е. во фракции, соответствующей вирусной РНК.

Если из этого пика извлечь РНК и обработать ее полинуклеотидфосфорилазой, которая осуществляет главным образом фосфоролиз одноцепочечной РНК, то 35S-РНК и до и после 10-минутной денатурации при 100° будет вести себя точно так же, как вирусная РНК (одноцепочечная).

Приведенные результаты позволяют считать, что тяжелая РНК, возникающая в присутствии актиномицина D через несколько часов после заражения вирусом ЕМС, действительно является вирусной РНК, образующейся под действием РНК-зависимой РНК-полимеразы. Эти данные подтверждают наличие в клетках животных РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Существование этого фермента было продемонстрировано также в цитоплазме L-клеток после заражения их вирусом Менго [139]. Но поскольку синтез всей клеточной РНК в отличие от синтеза вирусной РНК происходит, вероятнее всего, в ядрах (стр. 244), то эта РНК-зависимая РНК-полимераза является, по-видимому, фагоспецифичной. Подобные результаты были получены и в опытах с полиовирусом [211].

Биосинтез РНК в клетках, зараженных РНК-содержащими вирусами

На основании приведенных нами результатов можно считать, что клетки, зараженные РНК-вирусами, продуцируют РНК-зависимую РНК-полимеразу. Этот фермент называют также РНК-синтетазой или РНК-репликазой [31]. Она была обнаружена в различных типах клеток, зараженных РНК-содержащими вирусами бактерий [31, 142—146, 220], растений [201, 210] и животных [139—141, 148].

РНК-зависимый синтез РНК (стр. 161) особенно интенсивно изучался на культуре *Escherichia coli*, зараженной РНК-содержащими бактериофагами f2 или MS2 [142, 143, 145—147, 169—173]. При заражении бактериальной клетки такими РНК-фагами синтез вирусной РНК может происходить непосредственно на

цепях родительской РНК, служащих затравкой; однако возможно, что в этом процессе участвует какой-то промежуточный этап, включающий транскрипцию РНК на ДНК. В пользу первого предположения говорит множество экспериментальных данных. Например, при заражении фагом f2 штамма *Escherichia coli*, не синтезирующего тимина, выход фаговой f2-РНК в присутствии фторурацила не уменьшается, хотя синтез ДНК при этом подавлен. Далее присутствие актиномина D в концентрации, полностью угнетающей ДНК-зависимую РНК-полимеразу, не подавляет синтеза РНК фага MS2. Наконец, РНК фага MS2 не может гибридизоваться с ДНК клетки хозяина ни до, ни после заражения.

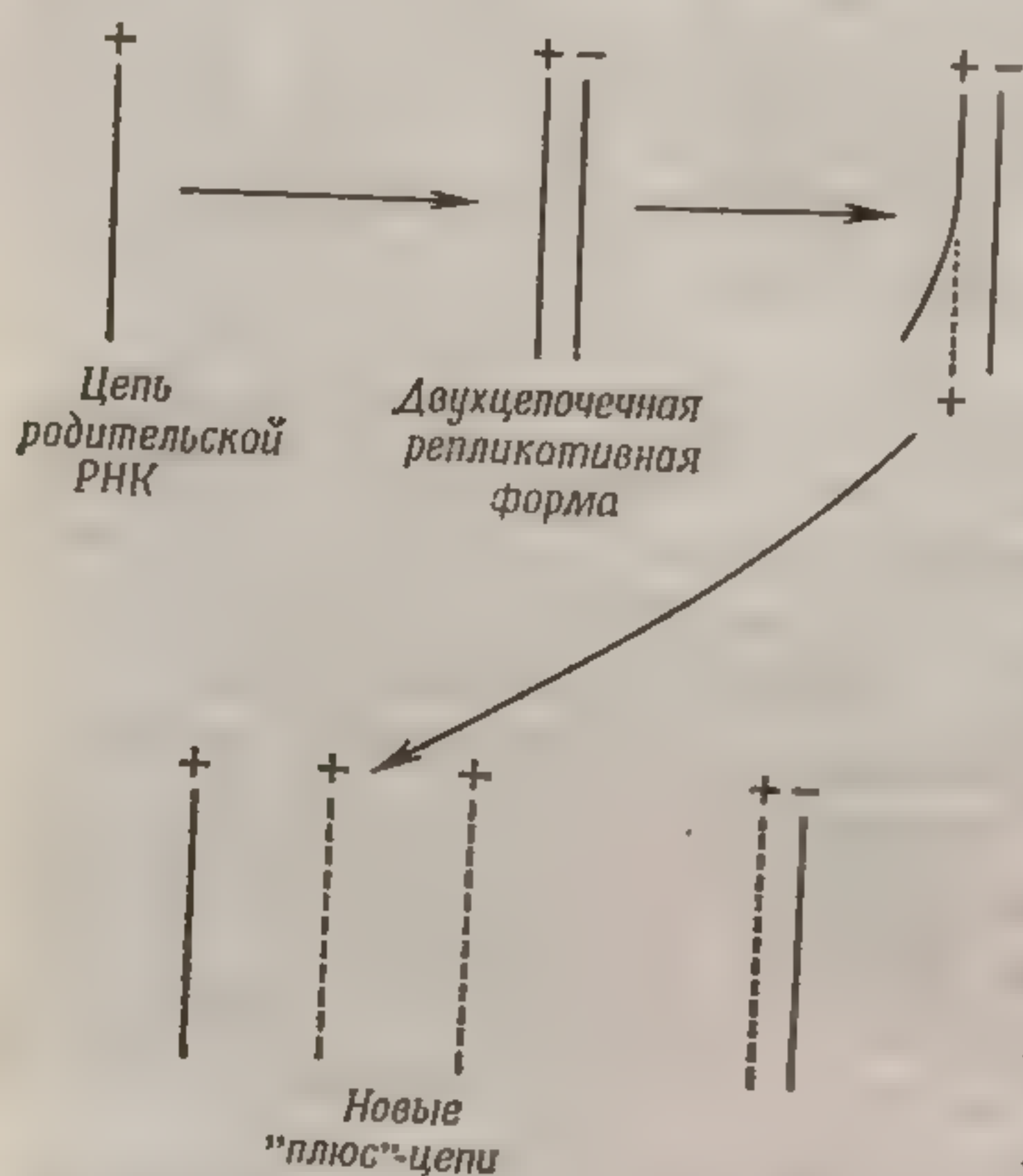
Более того, меченая инфекционная вирусная m-РНК сохраняется без изменений в течение всего цикла воспроизведения вируса и может затем быть выделена из лизата [146]. Следовательно, она не включается в вирусное потомство, а служит, вероятно, переносчиком необходимой информации для синтеза фермента, осуществляющего ее собственную репликацию и воспроизведение фаговых белков. Действительно, когда РНК фага f2 добавляют *in vitro* к системе, синтезирующей белок, то начинается синтез фагоспецифичных полипептидов, из которых строится оболочка фага (стр. 277). Таким образом, вирусная РНК несет генетическую информацию и может служить информационной РНК без всякой дальнейшей транскрипции.

В клетках *E. coli*, зараженных фагом MS2, меченым по фосфору, уже через несколько минут после заражения образуется меченое соединение, устойчивое к действию РНК-азы [171]. Оно было идентифицировано как двухцепочечная репликативная форма РНК фага MS2 (стр. 59 и стр. 161), во-первых, по профилю тепловой денатурации и температуре плавления, во-вторых, по поведению при центрифугировании в градиенте плотности сернокислого цезия и, в-третьих, по локализации радиоактивности в одной из цепей («плюс»-цепь), представляющей родительскую РНК фага MS2. Эта репликативная форма ДНК фага ϕ X174 (стр. 214).

В *E. coli*, зараженной фагом MS2, специфичная РНК-зависимая РНК-полимераза (РНК-синтетаза) появляется вскоре после заражения и достигает максимума через 30—45 мин. Эта полимеразы была выделена в очищенном виде из экстрактов зараженных клеток и отделена от ДНК-зависимой РНК-полимеразы и от полинуклеотидфосфорилазы [142, 171—173]. В очищенной форме она представляет собой голофермент, тесно связанный со своей природной матрицей, двухцепочечной репликативной формой РНК фага MS2. Этот голофермент синтезирует *in vitro* вирусную РНК фага MS2 типа родительской в присутствии четырех рибонуклеозид-

трифосфатов и в отсутствие экзогенной затравки. Часть образовавшегося продукта представляет собой двухцепочечную РНК, ничем не отличающуюся от репликативной формы РНК фага MS2, образующейся *in vivo* [172].

Если фермент, выделенный из клеток, зараженных фагом MS2, инкубировать с рибонуклеозидтрифосфатами, меченными C^{14} , то



Фиг. 85. Репликация вирусной РНК *in vivo*.

На родительской «плюс»-цепи образуется комплементарная «минус»-цепь. Эта образовавшаяся «минус»-цепь действует затем как матрица, на которой штампуется новая «плюс»-цепь (пунктир), вытесняя исходную «плюс»-цепь. Процесс затем много раз повторяется, в результате чего образуется целая группа новых «плюс»-цепей. Исходная родительская «плюс»-цепь остается неизменной.

Далее, на следующем этапе, эта образовавшаяся двухцепочечная репликативная форма играет роль матрицы при полуконсервативном способе образования новых «плюс»-цепей, которые вытесняют своих «двойников» из двухцепочечной матрицы

примерно половина метки, включившейся в кислотонерастворимое соединение, приходится на двухцепочечную РНК. Однако меченная таким способом двухцепочечная РНК составляет всего лишь одну пятидесятую от всего количества репликативной формы, полученной ферментативным путем. С помощью метода отжига было показано, что свыше 85% радиоактивности, включившейся в двухцепочечную РНК, оказалось включенным в родительскую РНК фага MS2 (в «плюс»-цепи).

На основании приведенных данных Очоа и его сотрудники [172, 173] пришли к выводу, что репликация вирусной РНК родительского типа («плюс»-цепь) происходит в два этапа. На первом этапе внедряющаяся цепь вирусной РНК действует как *m*-РНК (стр. 271), т. е. вступает в контакт с рибосомами клетки-хозяина и контролирует образование РНК-зависимой полимеразы и синтез белков вирусной оболочки. С помощью полимеразы на «плюс»-цепи, дей-

Пока еще не ясно, осуществляется ли катализ первой и второй стадий одним или двумя разными ферментами. Аналогичный процесс имеет место при репликации вируса МЕ [213].

Двухцепочечная репликативная форма, содержащая «плюс»- и «минус»-цепи, образуется и в растениях под действием вируса табачной мозаики [193, 201, 210] и вируса ЕМС [216] и является, очевидно, обязательной промежуточной стадией при воспроизведении всех РНК-содержащих вирусов.

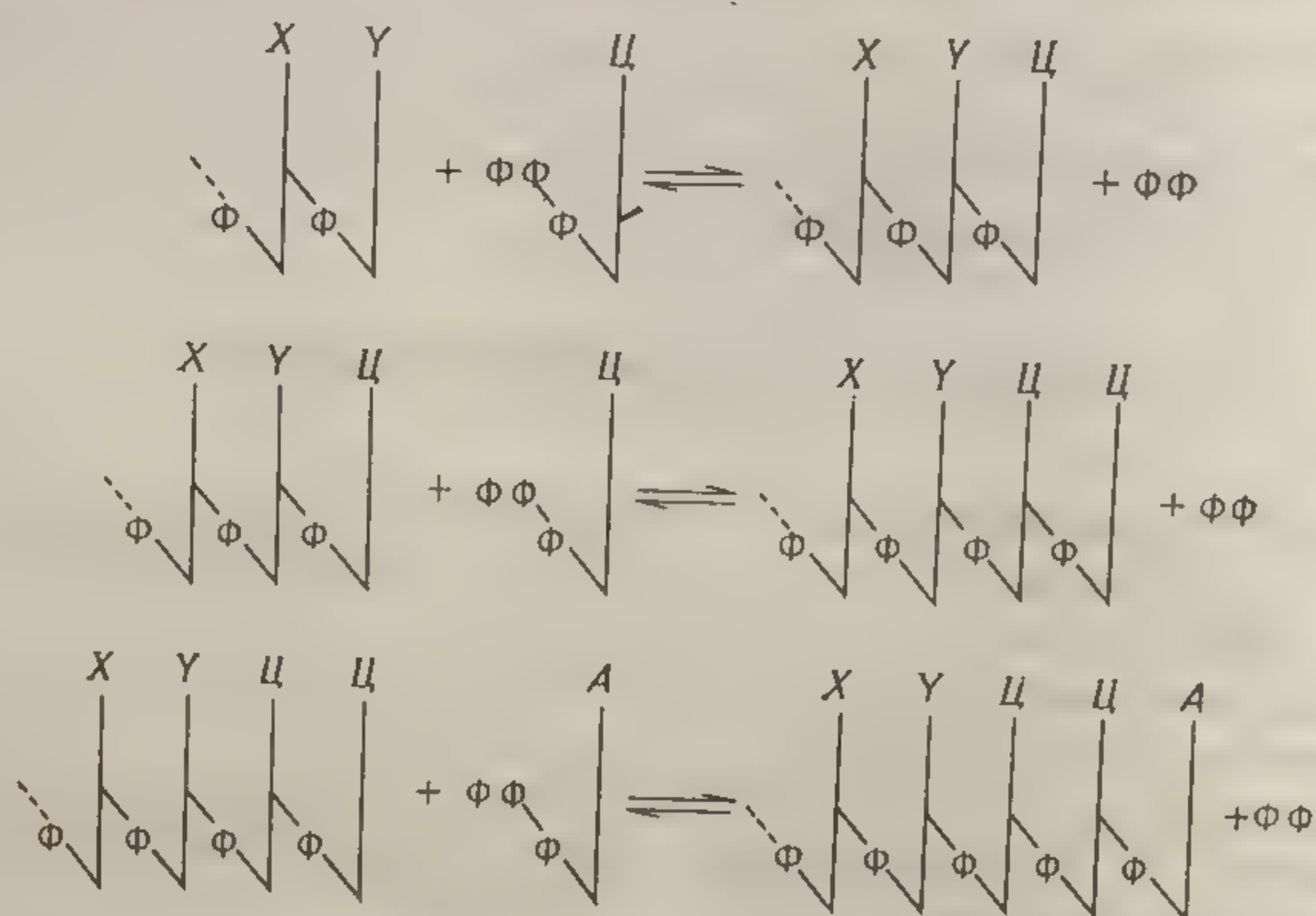
Концевое присоединение нуклеотидов к РНК

Добавление некоторого ограниченного числа нуклеотидных единиц к концу молекулы имеющегося полирибонуклеотида не может рассматриваться как полинуклеотидный синтез. Тем не менее эта реакция близка к нему, имеет большое значение и хорошо сейчас изучена. В 1956 г. было показано, что в присутствии фосфорилирующей системы P^{32} -адепозин-5'-монофосфат целиком включается в РНК в цитоплазме печени крыс [149]. После гидролиза диэстеразой змеиного яда был получен меченый 5'-АМФ, а после щелочного гидролиза — меченые цитидин-2'- и цитидин-3'-монофосфаты. Это говорит о том, что в РНК АМФ преимущественно присоединяется к ЦМФ. Подобные наблюдения на различных биологических объектах были проведены многими исследователями. Эти данные наряду с данными о том, что основная часть включенного аденина освобождается после щелочного гидролиза в виде нуклеозида, свидетельствуют о том, что АМФ присоединяется к концу цепи РНК. На важность этих наблюдений впервые обратили внимание Замечник, Хоглэнд и их сотрудники [150—152] в Бостоне, работавшие с растворимой, т. е. транспортной, РНК (*s*-РНК) цитоплазмы печени крысы. *s*-РНК отличается от РНК рибосом или микросом своеобразной способностью акцептировать нуклеотиды, присоединяясь к ним своей концевой группой. Такое присоединение нуклеотидов к концу цепи РНК обязательно предшествует прикреплению аминокислот в процессе биосинтеза белка. Все *s*-РНК из тканей животных, дрожжей и бактерий ведут себя в этом отношении одинаково.

Предшественниками терминально присоединяемых нуклеотидов служат рибонуклеозидтрифосфаты, и их присоединение сопровождается обратимым отщеплением пирофосфата, который при этом процессе накапливается и ингибирует концевое присоединение нуклеотидов.

Последовательность оснований в *s*-РНК пока еще не известна, но предварительная «инкубация» и затем осаждение при рН 5 позволяют получить акцептор, конечные группы которого обозна-

чим как X и Y (фиг. 86). К 3'-гидроксилу рибозы концевого нуклеотида Y сначала последовательно прикрепляются два остатка ЦМФ. Затем ЦМФ, ставший теперь конечным, присоединяет



Фиг. 86. Добавление концевых нуклеотидов к *s*-РНК, приводящее к образованию концевой последовательности фХфУфЦфЦфА.

к себе АМФ из молекулы АТФ, что сопровождается обычным отщеплением пирогосфата. В результате образуется следующая последовательность нуклеотидов в конце цепи *s*-РНК: фХфУфЦфЦфА.

Полинуклеотидфосфорилаза (К. Ф., 2.7.7.8)

Первые четкие данные о механизме ферментативного синтеза РНК были получены Очоа и его сотрудниками в 1955 г. [98, 153—155]. Они изолировали из *Azotobacter vinelandii* фермент, катализирующий синтез высокомолекулярных рибополинуклеотидов из нуклеотид-5'-дифосфатов, сопровождающийся выделением ортофосфата. Реакция обратима и требует наличия ионов магния. Равновесие в этой реакции достигается, когда 60—80% нуклеозиддифосфатов уже использовано для синтеза. Реакцию можно написать так:



где нуклеозид может соответствовать аденину, гипоксантину, урацилу или цитозину. Фермент, осуществляющий эту реакцию, был назван *полинуклеотидфосфорилазой*. Ему посвящено много обзо-

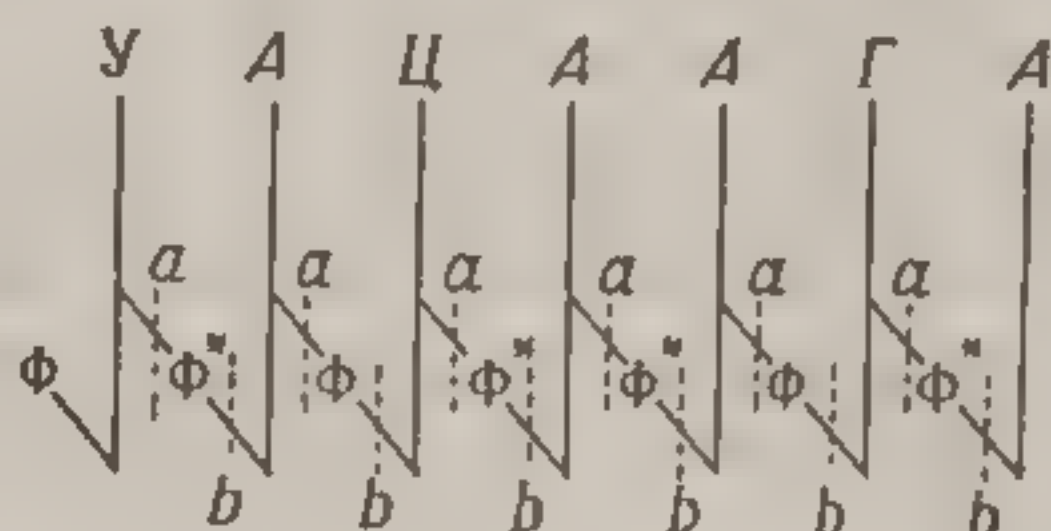
ров [98, 154—159, 189]. Он широко распространен в бактериях и был обнаружен также в растительных тканях. Пока еще мало убедительных данных о существовании полинуклеотидфосфорилазы в тканях животных. Ее легко можно выделить и очистить из бактериальных препаратов [160].

Путем инкубации фермента с соответствующими дифосфатами были получены однородные полимеры, состоящие только из АМФ, или только из УМФ, или только из ЦМФ, или только из ИМФ. Их называют соответственно А-, У-, Ц- и И-полимеры. Из эквимолярной смеси АДФ и УДФ был синтезирован смешанный (А, У)-полимер. Из смесей АДФ, ГДФ, УДФ и ЦДФ получили смешанный (А, Г, У, Ц)-полимер с молярными соотношениями 1 : 0,5 : 1 : 1 или 1 : 1 : 1 : 1. Последовательность нуклеотидов в таких полимерах носит случайный характер. Однородные полимеры, содержащие ГМФ, приготовить гораздо труднее; полириботимидиловую кислоту получить удалось, пользуясь в качестве субстрата синтетическим риботимидин-5'-фосфатом [162].

С помощью химического и ферментативного гидролиза было показано, что синтетические полинуклеотиды, как и РНК, состоят из нуклеозид-5'-монофосфатных единиц, связанных между собой 3',5'-фосфодиэфирными связями (стр. 46). Анализ концевых групп показал, что на конце полипептидной цепи находится фосфатная группа, этерифицированная по С-5' концевому нуклеозиду. При гидролизе щелочью, фосфодиэстеразой змеиного яда, фосфодиэстеразой из селезенки или панкреатической рибонуклеазой эти полимеры дают точно такие же продукты, как и РНК. Очоа и его сотрудники воспользовались перечисленными свойствами, чтобы выяснить природу межнуклеотидных связей, образуемых с помощью фермента. Они синтезировали (А, Г, У, Ц)-полимер с помощью фермента. Они синтезировали АДФ, меченный по фосфору, из смеси нуклеотидов, содержащей АДФ, меченный по фосфору, и затем гидролизовали его фосфодиэстеразой змеиного яда (фиг. 87). Из полученных после гидролиза четырех нуклеозид-5'-фосфатов меченым оказался только АМФ, и его удельная радиоактивность включала удельной радиоактивности первоначально включенного АМФ. Следовательно, во время синтеза фосфоэфирная связь АМФ не затрагивалась. Если же синтезированный полимер гидролизовали щелочью или фосфодиэстеразой селезенки, то метку включали каждый из четырех нуклеозид-3'-монофосфатов. Значит, в ходе синтеза полинуклеотидфосфорилаза формирует связи А—ф—А, Ц—ф—А, У—ф—А и Г—ф—А. Аналогичные результаты были получены с P^{32} -УДФ.

Следовательно, полинуклеотидфосфорилаза должна быть относительно неспецифична, поскольку она может катализировать образование межнуклеотидных связей между С-3' и С-5' по меньшей мере в восьми различных парах нуклеотидов [163, 164].

Молекулярные веса синтезированных полимеров варьируют от 30 000 до 2 000 000 и находятся в пределах тех молекулярных весов, которые характерны для РНК, полученных из различных источников. При рентгеноструктурном анализе (А, Г, У и Ц)-полимеры и (А, У)-полимеры дают такие же дифракционные картины, как и РНК [165]. Несколько отличаются лишь дифракционные картины нуклеотидов, содержащих только одно основание.



Фиг. 87. Гипотетический полинуклеотид типа поли-(АГУЦ), образованный из ГДФ, ЦДФ, УДФ и Р³²-АДФ.

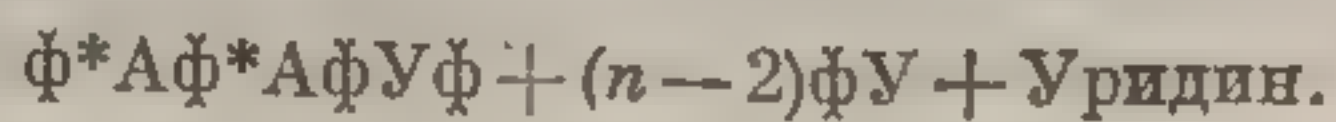
Расщепление цепи в точке *a* под действием диэстеразы змеиного яда дало бы смесь нуклеозид-5'-фосфатов, из которых только АМФ был бы меченым. Щелочной гидролиз или гидролиз диэстеразой из селезенки (в точках *b*) дал бы такую смесь нуклеозид-3'-фосфатов, в которой радиоактивной была бы часть каждого из нуклеотидов.

В присутствии эквимольных концентраций дифосфатов с помощью фермента, выделенного из *Azotobacter vinelandii*, был синтезирован (А, Г, У, Ц)-полимер. Он оказался очень сходным с РНК из *A. vinelandii* по молярному соотношению оснований. Он, кроме того, напоминал РНК из той устойчивой к действию рибонуклеазы фракции, которая стимулировала образование стрептолизина S (стр. 291) гемолитическими стрептококками [154].

При работе с неочищенными препаратами полинуклеотидфосфорилазы затравка не нужна. Но при работе с хорошо очищенными препаратами полинуклеотид начинает образовываться только после определенного лаг-периода; этот лаг-период можно устранить, если добавить небольшие количества полинуклеотида или даже некоторых олигонуклеотидов, например триадениловой $\phi - A - \phi - A - \phi - A$ или диадениловой $\phi - A - \phi - A$ кислот. Олигонуклеотидные затравки включаются во вновь образованные полинуклеотиды. Например, диадениловая кислота, меченная по фосфору, при инкубации с УДФ и очищенным ферментом образует полинуклеотид следующим образом:

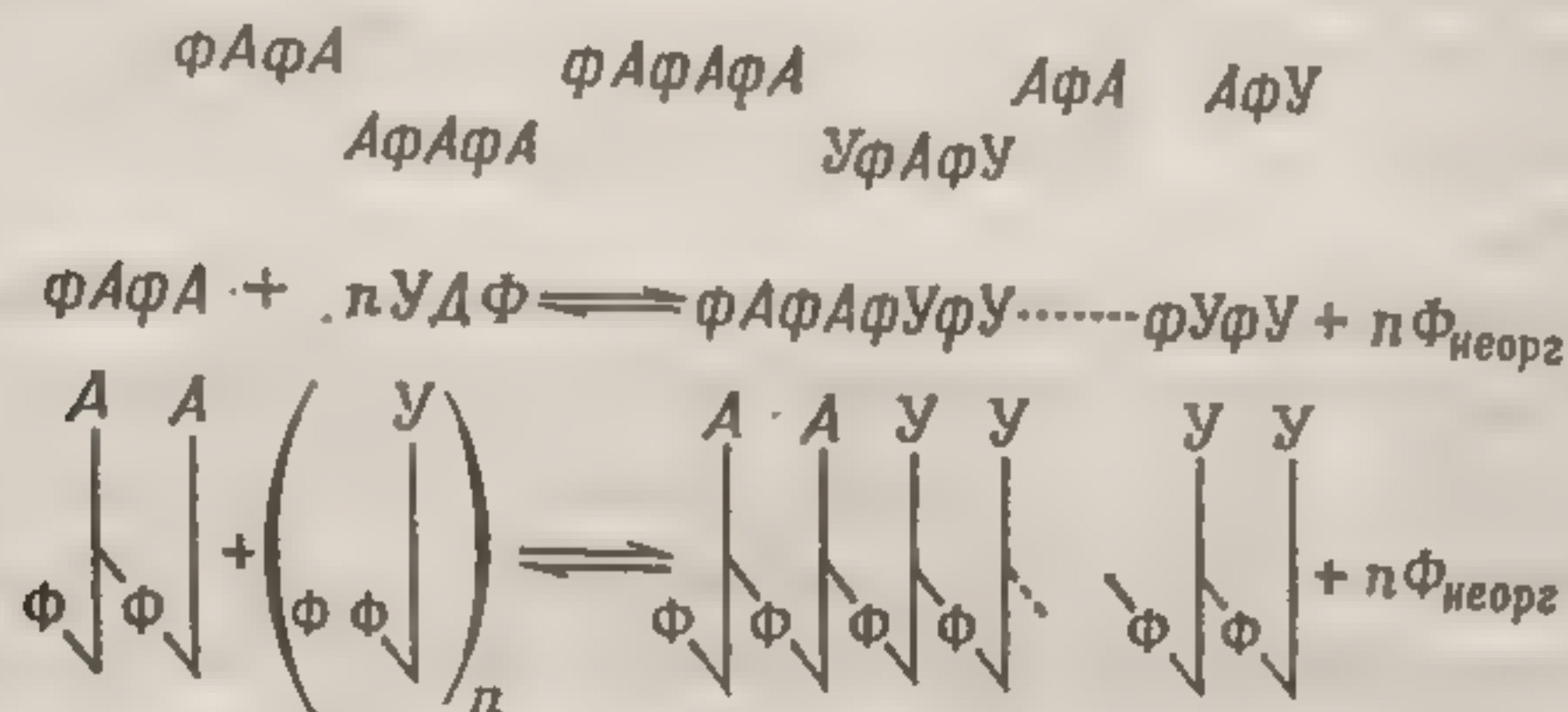


После гидролиза рибонуклеазой получают меченый тринуклеотид, 3'-УМФ и уридин:



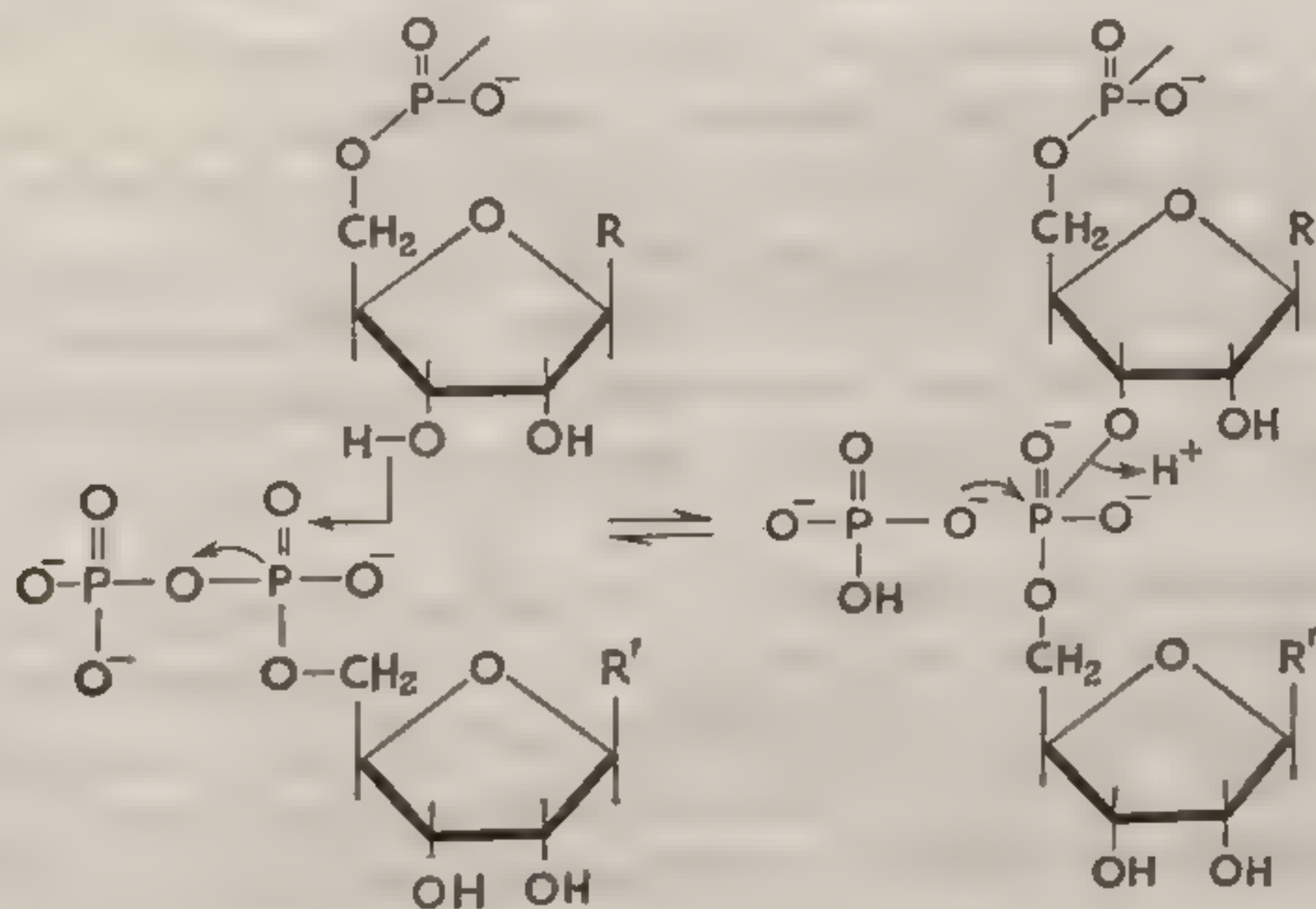
Затравка должна содержать по меньшей мере два нуклеозидных остатка, один из которых имеет свободную гидроксильную группу при С-3', которая и участвует в формировании новой фосфодиэфирной связи (фиг. 88). Первая связь возникает как

Возможные затравки



Фиг. 88. Затравки в полинуклеотидфосфорилазных реакциях.

диэфирный мостик между 5'-фосфатом уридинмонофосфатного остатка и свободным концевым С-3'-гидроксилом диадениловой кислоты



Фиг. 89. Механизм действия полинуклеотидфосфорилазы [161].

ФАФА. Затем цепь удлиняется за счет таких же реакций конденсации, причем затравка оказывается в составе образуемого полимера. Механизм этой реакции показан на фиг. 89.

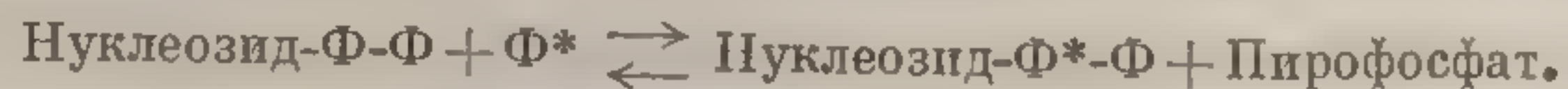
Олигонуклеотидные затравки неспецифичны, т. е. диадениловая кислота будет способствовать синтезу поли-А или поли-У, но полинуклеотидные затравки обладают некоторой специфичностью, т. е. поли-А может направлять свой собственный синтез, но не синтез поли-У или поли-(А, Г, У, Ц)-цепей. Молекулы поли-(А, Г, У, Ц) и поли-(А, У) могут быть использованы в каче-

стве затравки как для синтеза поли-А, так и для синтеза поли-У. Пока еще не установлено, включаются ли полинуклеотидные затравки в продукты синтеза, как это имеет место с олигонуклеотидными затравками.

Очищенный фермент содержит около 3% нуклеотидов в виде сложного олигонуклеотида, который, вероятно, действует как заранее «вмонтированная» затравка и обеспечивает некоторое, хотя и замедленное, течение реакции в отсутствие добавленной извне затравки.

В ряде опытов был изучен фосфоролиз, т. е. обращение реакции полимеризации [158, 166, 168]. Для этого используемый полинуклеотид инкубировали с ферментом в присутствии избытка неорганического фосфата, что приводило к образованию нуклеозиддифосфатов в результате последовательного отщепления мононуклеотидных единиц. Оказалось, что легко фосфоролизируются не только полимеры, полученные путем биосинтеза, но и обладающие затравочной активностью олигонуклеотиды. Динуклеотиды же и динуклеозидмонофосфаты, как и следовало ожидать, не поддаются фосфоролизу. РНК вируса табачной мозаики и высокополимерная РНК дрожжей могут легко подвергнуться фосфоролизу, но если дрожжевую РНК предварительно обрабатывают щелочью, то фосфоролиз протекает медленно. Медленно протекает и фосфоролиз многочисленных тяжелей, образованных, например, из поли-А и поли-У. Неполностью (на 20—30%) протекает фосфоролиз транспортной РНК клеточной цитоплазмы, что можно объяснить особенностями вторичного строения s-РНК. По-видимому, фосфоролиз затрагивает преимущественно концевые группы.

Было показано, что полинуклеотидфосфорилаза из *Azotobacter vinelandii* и *Escherichia coli* может также катализировать обменные реакции между нуклеозиддифосфатами и неорганическим фосфатом. У дрожжей, однако, фермент, ответственный за эту реакцию, можно отделить от полинуклеотидфосфорилазы [98, 162]:



Фракция полинуклеотидфосфорилазы в клетках точно не изучена [98]. Возможно, что она осуществляет главным образом распад РНК до нуклеозиддифосфатов, которые являются непосредственными предшественниками дезоксирибонуклеотидов (стр. 179); возможно даже, что она регулирует уровень неорганического фосфата в клетке. Она также может принимать участие в разрушении m-РНК [98—100].

ЛИТЕРАТУРА

1. Hurwitz J., Furth J. J., Anders M., Ortiz P. J., August J. T., *J. Chimie Physique*, 58, 934 (1961).
2. Weiss S. B., *Fed. Proc.*, 21, 120 (1962).
3. Weiss S. B., in *Informational Macromolecules*, p. 61 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963).
4. Hurwitz J., Furth J. J., Kahan F. M., in *Basic Problems in Neoplastic Disease*, p. 35 (A. Gellhorn and E. Hirschberg, Eds.), Columbia University Press (1962).
5. Hurwitz J., August J. T., in *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 1, p. 59 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Нуклеиновые кислоты, М., «Мир», 1965, стр. 74.)
6. Hurwitz J., Evans A., Babinet C., Skalka A., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 28, 59 (1963). (Ферменты и синтез биополимеров, М., «Мир», 1967, стр. 22.)
7. Smellie R. M. S., in *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 1, p. 27 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Нуклеиновые кислоты, М., «Мир», 1965, стр. 39.)
8. Stevens A., *Ann. Rev. Biochem.*, 32, 15 (1963).
9. Volkin E., in *Molecular Genetics*, Part I, p. 271 (J. H. Taylor, Ed.), New York, Academic Press (1963). (Молекулярная генетика, М., «Мир», 1964, стр. 299.)
10. Hurwitz J., Bresler A., Diringier R., *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 3, 15 (1960).
11. Weiss S. B., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 46, 1020 (1960).
12. Stevens A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 3, 92 (1960).
13. Burdon R. H., Smellie R. M. S., *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 93 (1961).
14. Burdon R. H., Smellie R. M. S., *Biochim. Biophys. Acta*, 51, 153 (1961).
15. Ochoa S., Burma D. P., Kröger H., Weill J. D., *Biochemistry*, 47, 670 (1961).
16. Furth J. J., Hurwitz J., Goldmann M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 4, 362 (1961).
17. Weiss S. B., Nakamoto T., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47, 694 (1961).
18. Stevens A., *J. Biol. Chem.*, 236, PC43 (1961).
19. Furth J. J., Hurwitz J., Goldmann M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 4, 431 (1961).
20. Chamberlin M., Baldwin R. L., Berg P., *J. Mol. Biol.*, 7, 334 (1963).
21. Hurwitz J., Furth J. J., Anders M., Evans A., *J. Biol. Chem.*, 237, 3752 (1962).
22. Weiss S. B., Nakamoto T., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47, 1400 (1961).
23. Josse J., Kaiser A. D., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, 236, 864 (1961).
24. Hall B. D., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47, 137 (1961).
25. Spiegelman S., *Sci. Amer.*, 210, 48 (1964).
26. Geiduschek E. P., Nakamoto T., Weiss S. B., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47, 1405 (1961).
27. Bautz E. K. F., Hall B. D., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48, 400 (1962).
28. Bolton E. T., McCarthy B. J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48, 1300 (1962).

29. Bolton E. T., McCarthy B. J., J. Mol. Biol., 8, 201 (1964).
30. Hoyer B. H., McCarthy B. J., Bolton E. T., Science, 140, 1408 (1963).
31. Haruna I., Nozu K., Ohtaka Y., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 905 (1963).
32. Chamberlin M., Berg P., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 81 (1962).
33. Furth J. J., Hurwitz J., Anders M., J. Biol. Chem., 237, 2611 (1962).
34. Nakamoto T., Fox C. F., Weiss S. B., J. Biol. Chem., 239, 167 (1964).
35. Stevens A., Henry J., J. Biol. Chem., 239, 196 (1964).
36. Krakow J., Ochoa S., in Methods in Enzymology, Vol. 6, p. 11 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.) (1963).
37. Hurwitz J., in Methods in Enzymology, Vol. 6, p. 23 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.) (1963).
38. Goldberg I. H., Rabinowitz M., Reich E., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 2094 (1962).
39. Hurwitz J., Furth J. J., Malamy M., Alexander M., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1222 (1962).
40. Kahan E., Kahan F. M., Hurwitz J., J. Biol. Chem., 238, 2491 (1963).
41. Goldberg I. H., Reich E., Rabinowitz M., Nature, 199, 44 (1963).
42. Chamberlin M., Berg P., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 67 (1963).
43. Chamberlin M., Berg P., J. Mol. Biol., 8, 297 (1964).
44. Sinsheimer R. L., Lawrence M., J. Mol. Biol., 8, 289 (1964).
45. Champe S. P., Benzer S., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 532 (1962).
46. Guild W. R., Robison M., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 106 (1963).
47. Marmur J., Greenspan C. M., Policek E., Kahan F. M., Levine J., Mandel M., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 191 (1963).
48. Marmur J., Greenspan C. M., Science, 142, 387 (1963).
49. Tocchini-Valentini G. P., Stodolsky M., Aurisicchio S. M., Fraziosi F., Weiss S. B., Geiduschek E. P., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 935 (1963).
50. Hall B. D., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 137 (1961).
51. Hayashi M., Hayashi M. N., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 664 (1963).
52. Hayashi M., Hayashi M. N., Spiegelman S., Science, 140, 1313 (1963).
53. Hayashi M., Hayashi M. N., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 351 (1964).
54. Roth J. S., Nature, 202, 182 (1964).
55. Wood W. B., Berg P., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 237 (1963).
56. Widnall C. C., Tata J. R., Biochim. Biophys. Acta, 72, 506 (1963).
57. Korner A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 13, 386 (1963).
58. Kenney F. T., Kull F. J., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 493 (1963).
59. Sekeris C. E., Lang N., Life Sciences, 3, 169 and 391 (1964).
60. Wilson J. D., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 93 (1963).
61. Yankofsky S. A., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 538 (1963).

62. Yankofsky S. A., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1466 (1962).
63. Yankofsky S. A., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1069 (1963).
64. Spiegelman S., Hayashi M., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 161 (1963).
65. Barclay I., Eason R., Smellie R. M. S. (1964).
66. Goodman H. M., Rich A., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 2101 (1962).
67. Giacomoni D., Spiegelman S., Science, 138, 1328 (1962).
68. McFarlane E. S., Fraser M. J., Biochem. Biophys. Res. Comm., 15, 351 (1964).
69. Hurwitz J., Gold M., Anders M., J. Biol. Chem., 3462 and 3474 (1964).
70. Svensson I., Boman H. G., Eriksson K. G., Kjellin K., J. Mol. Biol., 7, 254 (1963).
71. Srinivasan P. R., Borek E., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 529 (1963).
72. Gold M., Hurwitz J., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 149 (1963).
73. Borek E., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 139 (1963).
(Ферменты и синтез биополимеров, М., «Мир», 1967, стр. 124.)
74. Fox C. F., Weiss S. B., J. Biol. Chem., 239, 175 (1964).
75. Stevens A., J. Biol. Chem., 239, 204 (1964).
76. Lipmann F., in Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 1, p. 135 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
77. Hurwitz J., Furth J. J., Scientific American (Feb.), p. 3 (1962).
78. Spiegelman S., Fed. Proc., 22, 36 (1963).
79. Gros F., Gilbert W., Hiatt H. H., Attardi G., Spahr P. F., Watson J. D., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 26, 111 (1961).
80. Gros F., Naono S., Woese C., Willson C., Attardi G., in Informational Macromolecules, p. 387 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 301.)
81. Gros F., Dubert J. M., Tissieres A., Bourgeois S., Michelson M., Soffer R., Legault L., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 299 (1963). (Синтез и структура нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1966, стр. 291.)
82. Jacob F., Monod J., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 26, 193 (1961). (Регуляторные механизмы клетки, М., «Мир», 1964, стр. 278.)
83. Jacob F., Monod J., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 3, 318 (1961).
84. Watson J. D., Science, 140, 17 (1963).
85. Gros F., Naono S., Hayes D., Hayes F., Watson J. D., Colloques Internationaux du Centre de la Recherche Scientifique, p. 437 (1962).
86. Monod J., Jacob F., Gros F., Biochem. Soc. Symp., 21, 104 (1961).
87. Hershey A. D., Dixon J., Chase M., J. Gen. Physiol., 73, 110 (1953).
88. Volkin E., Astrachan L., Virology, 2, 149 (1956).
89. Volkin E., Astrachan L., Virology, 2, 433 (1956).
90. Nomura M., Hall B. D., Spiegelman S., J. Mol. Biol., 2, 306 (1960).

91. Spiegelman S., Hall B. D., Storck R., Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 1135 (1961).
92. Spiegelman S., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 26, 75 (1961).
(Регуляторные механизмы клетки, М., «Мир», 1964, стр. 111.)
93. Brenner S., Jacob F., Meselson M., Nature, 190, 576 (1961).
94. Gros F., Hiatt H., Gilbert W., Kurland C. G., Risebrough R. W., Watson J. D., Nature, 190, 581 (1961).
95. Hayashi M., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 1564 (1961).
96. Risebrough R. W., Tissieres A., Watson J. D., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 430 (1962).
97. Levinthal C., Keynan A., Higa A., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1631 (1962).
98. Grunberg-Manago M., in Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 1, p. 93 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Нуклеиновые кислоты, М., «Мир», 1965, стр. 112.)
99. Harris H., in Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 2, p. 20 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963).
100. Andoh T., Natori S., Mizuno D., Biochim. Biophys. Acta, 76, 477 (1963).
101. Otake E., Mitsui H., Osawa S., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 425 (1962).
102. Prescott D. M., in Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 3, p. 33 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1964).
103. Harris H., Fisher H. W., Rodgers G., Spencer T., Watts J. W., Proc. Roy. Soc., B, 157, 177 (1963).
104. Harris H., Watts J. W., Proc. Roy. Soc., B, 156, 109 (1962).
105. Harris H., LaCour L. F., Nature, 200, 227 (1963).
106. Harris H., Nature, 201, 863 (1964).
107. Harris H., Nature, 202, 249 (1964).
108. Hiatt H. H., J. Mol. Biol., 5, 217 (1962).
109. Brawerman G., Gold L., Eisenstadt J., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 630 (1963).
110. Георгиев Г. П., Мантиева В. Л., Biochim. Biophys. Acta, 61, 153 (1962).
111. Георгиев Г. П., Самарина О. П., Лерман М. И. и Смирнов М. Н. Nature, 200, 1291 (1963).
112. Cheng P.-Y., Biochim. Biophys. Acta, 53, 235 (1961).
113. Sibatani A., de Kloet S. R., Allfrey V. G., Mirsky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 471 (1962).
114. Marks P. A., Willson C., Kruh J., Gros F., Biochem. Biophys. Res. Comm., 8, 9 (1962).
115. Scherrer K., Darnell J. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., 7, 486 (1962).
116. Lang N., Sekeris C. E., Life Sciences, 3, 161 (1964).
117. Darnell J. E., Penman S., Scherrer K., Becker Y., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 211 (1963).
118. Munro A. J., Korner A., Biochem. J., 85, 37P (1962).
119. Munro A. J., Korner A., Nature, 201, 1194 (1964).
120. DiGirolamo A., Henshaw E. C., Hiatt H. H., J. Mol. Biol., 8, 479 (1964).
121. McArdle A. H., Biochim. Biophys. Acta, 68, 569 (1963).

122. Hill
Acta.
123. Hoag
130
124. Tiss
(1961)
125. Sche
Sci.,
126. Easo
238,
127. Bonn
Acad.
128. Loen
129. Loen
130. Salz
Biol.,
131. Beck
132. Nak
(1962)
133. Augu
3786
134. Fox
J. Bi
135. Krak
136. Burd
633
137. Clin
238,
138. Wyk
139. Balt
Quan
140. Balt
141. Holl
142. Wei
Harb
143. Aug
Cold
144. Hom
Gra
M.
145. Wei
146. Spi
28,
1966
147. Kel
148. Bal
1034
149. Hei
gi
150. Ho
J. I
151. Zam
152. He
Nat
153. Gru
Bio

122. Hill M., Miller-Faures A., Errera M., Biochim. Biophys. Acta, 80, 39 (1964).
123. Hoagland M. B., Askonas B. A., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 130 (1963).
124. Tissieres A., Hopkins J. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 2015 (1961).
125. Scherrer K., Latham H., Darnell J. E., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 240 (1963).
126. Eason R., Cline M. J., Smellie R. M. S., J. Biol. Chem., 238, 3978 (1963).
127. Bonner J., Huang R. C., Maheshwari N., Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 1548 (1961).
128. Loening U. E., Biochem. J., 84, 90P (1962).
129. Loening U. E., Nature, 195, 467 (1962).
130. Salzman N. P., Shatkin A. J., Sebring E. D., J. Mol. Biol., 8, 405 (1964).
131. Becker Y., Joklik W. K., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 577 (1964).
132. Nakamoto T., Weiss S. B., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 880 (1962).
133. August J. T., Ortiz P. J., Hurwitz J., J. Biol. Chem., 237, 3786 (1962).
134. Fox C. F., Robinson W. S., Haselkorn R., Weiss S. B., J. Biol. Chem., 259, 186 (1964).
135. Krakow J. S., Ochoa S., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 88 (1963).
136. Burdon R. H., Smellie R. M. S., Biochim. Biophys. Acta, 61, 633 (1962).
137. Cline M. J., Eason R., Smellie R. M. S., J. Biol. Chem., 238, 1788 (1963).
138. Wykes J., Smellie R. M. S. (1964).
139. Baltimore D., Franklin R. M., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 105 (1963).
140. Baltimore D., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 450 (1964).
141. Holland J. J., Peterson J. A., J. Mol. Biol., 8, 556 (1964).
142. Weissman C., Simon L., Borst P., Ochoa S., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 99 (1963).
143. August J. T., Cooper S., Shapiro L., Zinder N. D., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 95 (1963).
144. Homma M., Rake A. V., Paranchych W., Ellis D. B., Graham A. F., Viruses, Nucleic Acids and Cancer, p. 191, M. D. Anderson Symp., Houston, Texas (1963).
145. Weissman C., Borst P., Science, 142, 1188 (1963).
146. Spiegelman S., Doi R. H., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 109 (1963). (Синтез и структура нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1966, стр. 138.)
147. Kelly R. B., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 8, 602 (1964).
148. Baltimore D., Becker Y., Darnell J. E., Science, 143, 1034 (1964).
149. Heidelberger C., Harbers E., Leibman K. C., Takagi Y., Potter V. R., Biochim. Biophys. Acta, 20, 445 (1956).
150. Hoagland M., The Nucleic Acids, Vol. 3, p. 349 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1960).
151. Zamecnik P. C., The Harvey Lectures, 54, 256 (1960).
152. Hecht L. I., Stephenson L., Zamecnik P. C., Proc. Nat. Acad. Sci., 45, 505 (1959).
153. Grunberg-Manago M., Ortiz P. J., Ochoa S., Biochim. Biophys. Acta, 20, 269 (1956).

154. Ochoa S., Les Neucleoproteins, Onzième Conseil de Chimie, Institut de Chimie Solvay, p. 241, Bruxelles, R. Stoepts (1960).
155. Enzymes in Polynucleotide Metabolism, Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 511-804 (1959).
156. Ochoa S., Angew. Chemie, 82, 225 (1960).
157. Singer M. F., Heppel L. A., Hilmoe R. J., Ochoa S., Mii S., Proc. 3rd Cancer Res. Confer., 3, 41 (1959).
158. Heppel L. A., Singer M. F., Hilmoe R. J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 635 (1959).
159. Hilmoe R. J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 660 (1959).
160. Ochoa S., Basilio C., Krakow J. S., in Methods in Enzymology, Vol. 6, p. 3 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1963).
161. Khorana H. G., in The Nucleic Acids, Vol. 3, p. 105 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1960).
162. Griffin B. E., Todd A., Rich A., Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 44, 1123 (1958).
163. Heppel L. A., Ortiz P. J., Ochoa S., J. Biol. Chem., 229, 679 (1957).
164. Heppel L. A., Ortiz P. J., Ochoa S., J. Biol. Chem., 229, 695 (1957).
165. Rich A., Les Nucleoproteins, Onzième Conseil de Chimie, Institut de Chimie Solvay, p. 1, Bruxelles, R. Stoepts (1959).
166. Grunberg-Manago M., J. Mol. Biol., 1, 240 (1959).
167. Weiss S. B., Nakamoto T., J. Biol. Chem., 236, PC19 (1961).
168. Canellakis E. S., Biochem. J., 77, 14P (1960).
169. Ohtaka Y., Spiegelman S., Science, 142, 493 (1964).
170. Kaerner H. C., Hoffmann-Berling H., Nature, 202, 1012 (1964).
171. Weissman C., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., Ochoa S., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 682 (1964).
172. Weissman C., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., Ochoa S., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 890 (1964).
173. Ochoa S., Weissman C., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., Fed. Proc., 23, 1285 (1964).
174. Weill J. D., Busch S., Chambon P., Mandel P., Biochem. Biophys. Res. Comm., 10, 122 (1963).
175. McCarthy B. J., Bolton E. T., J. Biol., 8, 184 (1964).
176. Bremer H., Konrad M. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 801 (1964).
177. Nygaard A. P., Hall B. D., Biochem. Biophys. Res. Comm., 12, 98 (1963).
178. Hiatt H. H., Henshaw E. C., DiGirolamo A., Metabolic Control Mechanisms in Animal Cells, National Cancer Institute Monograph No. 13, p. 131 (1964).
179. Revel M., Hiatt H. H., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 810 (1964).
180. Pelling G., Chromosoma, 15, 71 (1964).
181. Edström J. E., Beerman W., J. Cell Biol., 14, 371 (1962).
182. Falaschi A., Adler J., Khorana H. G., J. Biol. Chem., 238, 3080 (1963).
183. Korner A., Munro A. J., Nature, 199, 489 (1963).
184. Penman S., Scherrer K., Becker Y., Darnell J. E., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 654 (1963).
185. Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 786 (1964).
186. Gomatos P. J., Krug R. M., Tamm I., J. Mol. Biol., 9, 193 (1964).

187. Nygaard A. P., Hall B. D., J. Mol. Biol., 9, 125 (1964).
188. Hall B. D., Nygaard A. P., Green M. H., J. Mol. Biol., 9, 143 (1964).
189. Grunberg-Manago M., Progress in Biophysics and Molecular Biology, (J. A. V. Butler, Ed.), 13, 175 (1963).
190. Chamberlin M., Berg P., J. Mol. Biol., 8, 708 (1964).
191. Gilbert W., J. Mol. Biol., 6, 374 and 389 (1963).
192. Noll H., Staehelin T., Wettstein F. O., Nature, 198, 632 (1963).
193. Mandel H. G., Watthews R. E. F., Matus A., Ralph R. K., Biochem. Biophys. Res. Comm., 16, 604 (1964).
194. Bergstrand A., Eliasson N. A., Hammersten E., Norberg B., Reichard P., Ubbisch H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 13, 22 (1948).
195. Smellie R. M. S., McIndoe W. M., Logan R., Davidson J. N., Dawson I. A., Biochem. J., 54, 280 (1953).
196. Crosbie G. W., Smellie R. M. S., Davidson J. N., Biochem. J., 54, 287 (1953).
197. McIndoe W. M., Davidson J. N., Brit. J. Cancer, 6, 200 (1952).
198. Marshak A., Vogel H. J., J. Cell Comp. Physiol., 36, 97 (1950).
199. Jeener R., Szafarz D., Arch. Biochem., 26, 54 (1950).
200. Barnum C. P., Huseby R. A., Arch. Biochem., 29, 7 (1950).
201. Burdon R. H., Billeter M. A., Weissman C., Warner R. C., Ochoa S., Knight C. A., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 7681 (1964).
202. Kaener H. C., Hoffman-Berling, Nature, 202, 1012 (1964).
203. Konrad M. W., Stent G. S., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 647 (1964).
204. Montagnier L., Saunders F. K., Nature, 199, 664 (1963).
205. Sekeris C. E., Lang N., Life Sciences, 3, 625 (1964).
206. Korner A., Biochem. J., 92, 449 (1964).
207. Geiduschek E. P., Tocchini-Valentini G. P., Sarnat M. T., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 486 (1964).
208. Simon E. J., van Praag D., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 1151 (1964).
209. Jones K. W., Truman D. E. S., Nature, 202, 1264 (1964).
210. Shipp W., Haselkorn R., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 401 (1964).
211. Baltimore D., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 450 (1964).
212. Tamm I., Nemes M. M., Osterhaut S., J. Exp. Med., 111, 339 (1960).
213. Hausen P., Biochem. J., 94, 4P (1964).
214. Bassel A., Hayashi M., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 796 (1964).
215. Eason R., Smellie R. M. S., Biochem. J., 94, 3P (1964).
216. Montagnier L., Sanders F. K., Nature, 199, 664 (1963).
217. Sachs L., Acidi nucleici e loro funzione biologica, p. 316, Milan, Istituto Lombardo (1964).
218. McCarthy B. J., Hoyer B. H., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 915 (1964).
219. Nishimura S., Jacob T. M., Khorana H. G., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 1494 (1964).
220. Jenwick M. L., Erikson R. L., Franklin R. M., Science, 146, 527 (1964).

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ РНК

Перенос генетической информации

Биологическая информация хранится в клетке в виде последовательного расположения оснований в молекуле ДНК. В процессе ее удвоения, или репликации (стр. 194), воспроизводятся точные копии ДНК, которые и осуществляют передачу информации о наследуемых свойствах. Затем происходит транскрипция, во время которой генетическая информация переносится от ДНК на комплементарную, или информационную, РНК. И наконец, в ходе белкового синтеза генетическая информация транслируется с четырехбуквенного языка информационной РНК на двадцатибуквенный язык белков [111]. Биосинтез белка подробно разбирается в многочисленных обзорах [1—19, 90, 118]. Здесь же мы коснемся его кратко и лишь в той мере, в какой это необходимо, чтобы рассмотреть роль нуклеиновых кислот в этом процессе.

РНК и белковый синтез

Первое указание на возможность какого-то участия РНК в белковом синтезе было получено довольно давно в работах Касперсона [20] и Браше [21]. Независимо друг от друга и при помощи различных гистохимических методов Касперсон и Браше обнаружили, что особенно богаты рибонуклеиновой кислотой клетки, в которых синтез белка происходит особенно интенсивно. Эти наблюдения многократно подтверждались. В настоящее время мы уже хорошо представляем себе роль и *m*-РНК и *s*-РНК в белковом синтезе.

В развитии наших знаний в этой области, как отмечает Замечник [3], можно различить три четко выраженных этапа:

1. Этап разрушения (дезинтеграции) клетки; этот этап был посвящен поискам той бесклеточной системы, которая может осуществить синтез белка.

2. Этап воссоздания системы, период, когда изучали, какие из различных компонентов неочищенного клеточного гомогената необходимы для белкового синтеза.

3. Макромолекулярный этап, во время которого были изучены детально механизм реакции и пространственная конфигурация тех макромолекулярных систем, которые участвуют в биосинтезе белка.

Выделение бесклеточной системы, ответственной за синтез белка

Давно проведенные опыты Гэйла с сотрудниками [22—27] и Спигелмана [28—31] показали, что для успешного синтеза белка в бесклеточной системе из микроорганизмов необходимо присутствие РНК. По существу такие же результаты были получены в опытах с бесклеточными системами из клеток животных [3, 32—40], причем особенное внимание Замечник, Хоглэнд и другие исследователи уделяли значению рибосом, входящих в эти системы (стр. 278).

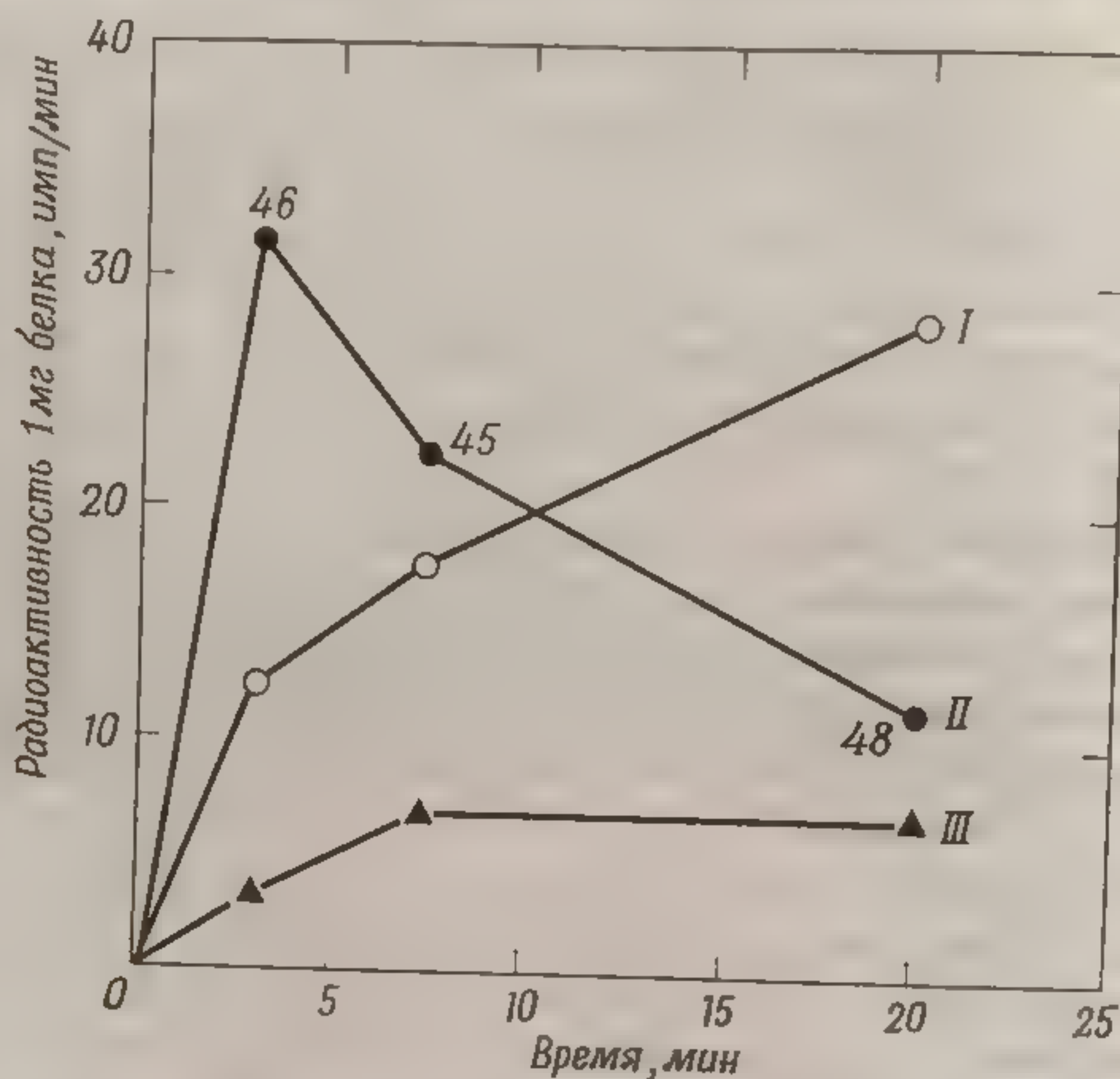
Если суспензию микросом из печени крысы обработать дезоксихолатом, то рибосомы (стр. 131) отделяются от микросомных частиц и их можно выделить центрифугированием при 105 000 g в виде фракции, нерастворимой в дезоксихолате. Показано, что в них содержится вся РНК и одна шестая часть белка исходных микросом [36]. Мы уже обсуждали строение рибосом в гл. VIII.

Для изучения белкового синтеза крысам вводили внутривенно C^{14} -лейцин и C^{14} -валин (аминокислоты, участие которых в реакциях, не связанных с белковым синтезом, незначительно). Затем через различные, но короткие интервалы времени извлекали печень и приготавливали взвеси микросом. Оказалось, что белок рибосом, нерастворимых в дезоксихолате, очень быстро (меньше чем за 5 мин), интенсивно включает метку, после чего его радиоактивность резко падает (фиг. 90). Вместе с тем включение метки в белок микросом, растворимый в дезоксихолате, протекает значительно слабее и продолжается по меньшей мере 20 мин.

Эти данные позволяют думать, что *in vivo* рибосомы в печени крысы участвуют в быстрых превращениях, в ходе которых синтезируются белки или большие пептидные фрагменты, которые затем, возможно, перемещаются в другие части клетки. По скорости включения метки в рибосомы фактически можно судить о скорости почти всего белкового синтеза в печени; однако не исключено, что синтез белка может протекать и в других частях клетки, например в ядре (стр. 287).

Включение меченых аминокислот также можно изучать, пикетируя аминокислоты в бесклеточной системе, полученной из печени крысы. При работе обычными методами синтеза белок можно и не обнаружить, поскольку вполне возможно, что накопления белка в такой системе происходить не будет.

Критерием белкового синтеза может служить включение C^{14} -аминокислот, если соблюдаются следующие условия: 1) включение протекает необратимо, т. е. если смесь продолжают инкубировать в присутствии избытка той же аминокислоты, но не радиоактивной, исчезновения C^{14} -аминокислот из белка не наблюдается; 2) для включения необходимо присутствие АТФ или АТФ-генерирующей системы; 3) включенная аминокислота образует



Фиг. 90. Включение *in vivo* небольших доз C^{14} -лейцина в два компонента микросом и в растворимый белок клеток печени. 0,16 мкмоль C^{14} -лейцина было введено внутривенно в начале опыта. Приведенные на графике величины указывают долю (%) РНК в каждой нерастворимой в дезоксихолате пробе. I — фракция, растворимая в дезоксихолате; II — фракция, нерастворимая в дезоксихолате; III — растворимый белок клетки [38].

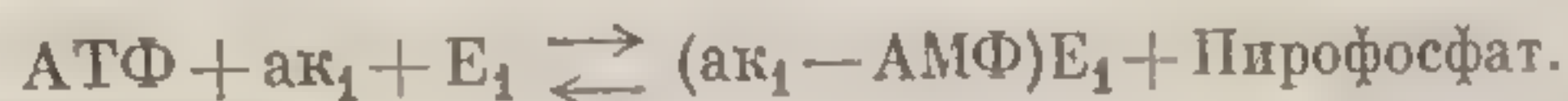
с другими аминокислотами белка α -связи и после частичного гидролиза обнаруживается в идентифицируемых пептидах; 4) включенная аминокислота находится внутри пептидной цепи, а не на ее конце.

В идеальном случае следовало бы продемонстрировать точно, какое положение занимает в белке C^{14} -аминокислота, и показать, что ее включение зависит от добавления других аминокислот, обычно находимых в белках.

В целом эти условия соблюдаются в опытах с экстрактами из печени крыс. Из опытов Замечника и его сотрудников следовало, что включение меченых аминокислот позволяет измерить

даже небольшой идущий *de novo* синтез пептидов и фактически является относительно необратимым этапом белкового синтеза. На основании полученных результатов Замечник выдвинул следующую концепцию: «Цитоплазматические рибонуклеопротеидные частицы являются местом первоначального включения свободных аминокислот в белки, при этом только очень незначительная доля всего количества аминокислот в этих частицах может быть использована в этой стремительно идущей реакции».

По ряду причин, которых мы здесь касаться не будем, кажется весьма вероятным, что действие АТФ заключается в активации карбоксильных групп свободных аминокислот с помощью специального активирующего фермента [40—42]. Его можно получить из тканевых гомогенатов отделением надосадочной жидкости из микросомной фракции и осаждением белка при рН 5 (фракция «рН5-фермента»). Фермент E_1 осуществляет активацию аминокислоты, согласно следующему уравнению реакции:



Сейчас показано, что активацию каждой аминокислоты производит отдельный фермент — лигаза (К. Ф., 6.1.1). Активированные по карбоксилу аминокислоты можно выделить в виде α -аминогидроксамовых кислот, используя высокие концентрации гидроксиламина.

Подводя итоги имеющимся данным, мы можем с уверенностью сказать, что для биосинтеза белка *in vitro* необходимы следующие компоненты [5, 8, 41—46]: аминокислоты, АТФ, Mg^{2+} , активирующие ферменты, ГТФ, микросомы или полученные из них рибосомы и *s*-РНК.

Функция *s*-РНК заключается в акцептировании аминокислот из аминокислацил-АТФ комплекса $(\text{ак} - \text{АМФ})E$ и переносе их на рибосомы [44—46].

Роль *s*-РНК

Химические свойства растворимой, или транспортной, РНК были описаны раньше (стр. 58). Мы уже говорили о том, что молекула *s*-РНК состоит примерно из 75 нуклеотидов, причем ее конец, акцептирующий аминокислоты, имеет строение ... $\phi\psi\psi\phi A$. Молекула *s*-РНК представляет собой сложенную вдвое цепочку, закрученную в виде двойной спирали. Эта концепция о строении *s*-РНК основывается на эквивалентности оснований А и У, Ц и Г, на сильном гиперхромическом эффекте при нагревании и на данных рентгеноструктурного анализа. В центре цепи находится петля или изгиб; этот участок цепи богат метилированными основаниями и псевдоуридином; он содер-

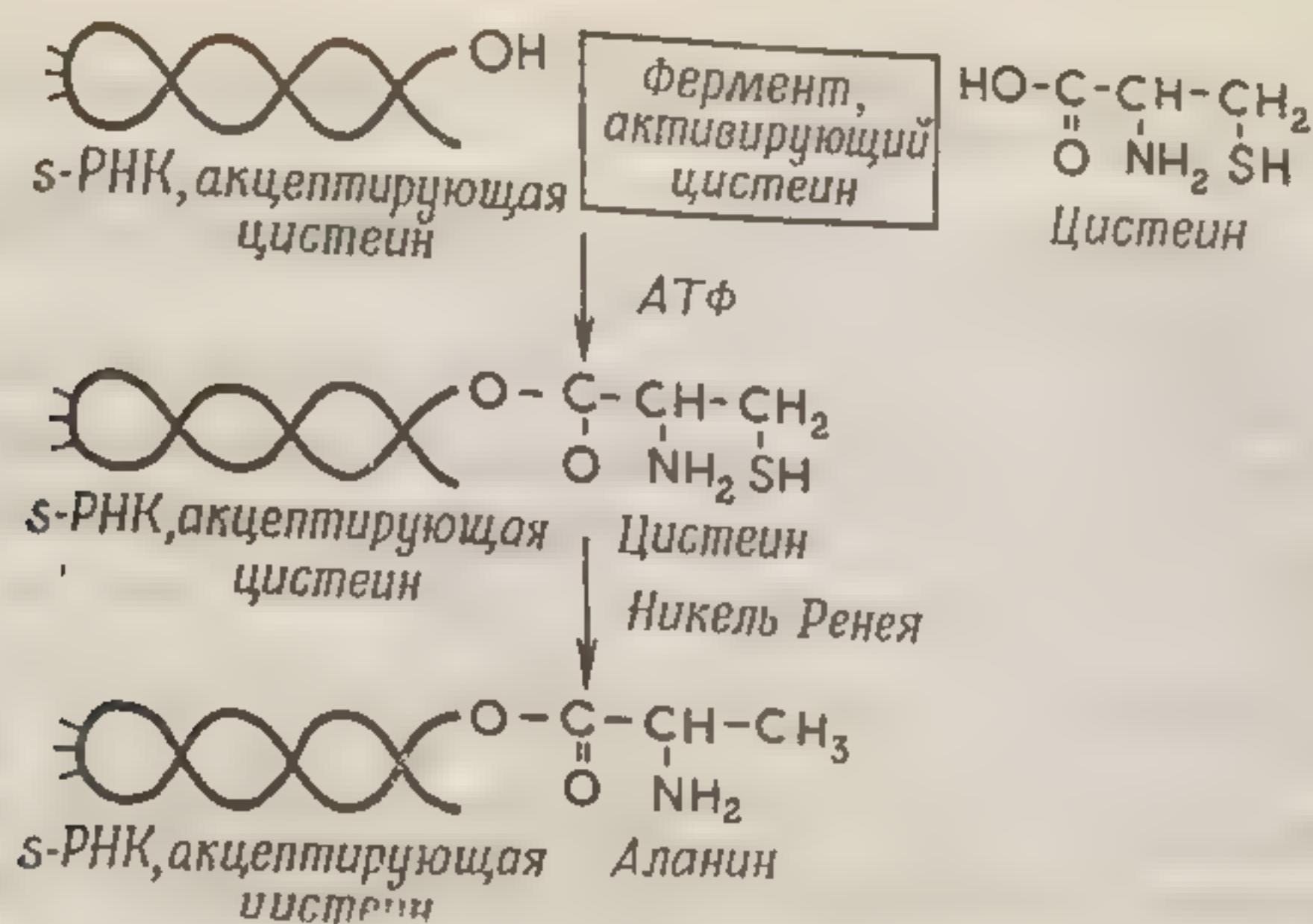
жит кодирующий участок (антикодон), которым *s*-РНК присоединяется к соответствующему месту на *m*-РНК.

Транспортная РНК выполняет две отдельные функции: во-первых, она «узнает» специфический активирующий фермент и поэтому может акцептировать именно соответствующую активированную аминокислоту [3] и, во-вторых, вместе с *m*-РНК она участвует в реализации кода, обеспечивая переносимой аминокислоте присоединение к растущей полипептидной цепи как раз в том месте, где необходимо. По-видимому, вторичная структура *s*-РНК не участвует в распознавании активирующего фермента, потому что при нагревании, нарушающем обычно вторичную структуру, способность акцептировать аминокислоты не ослабевает.

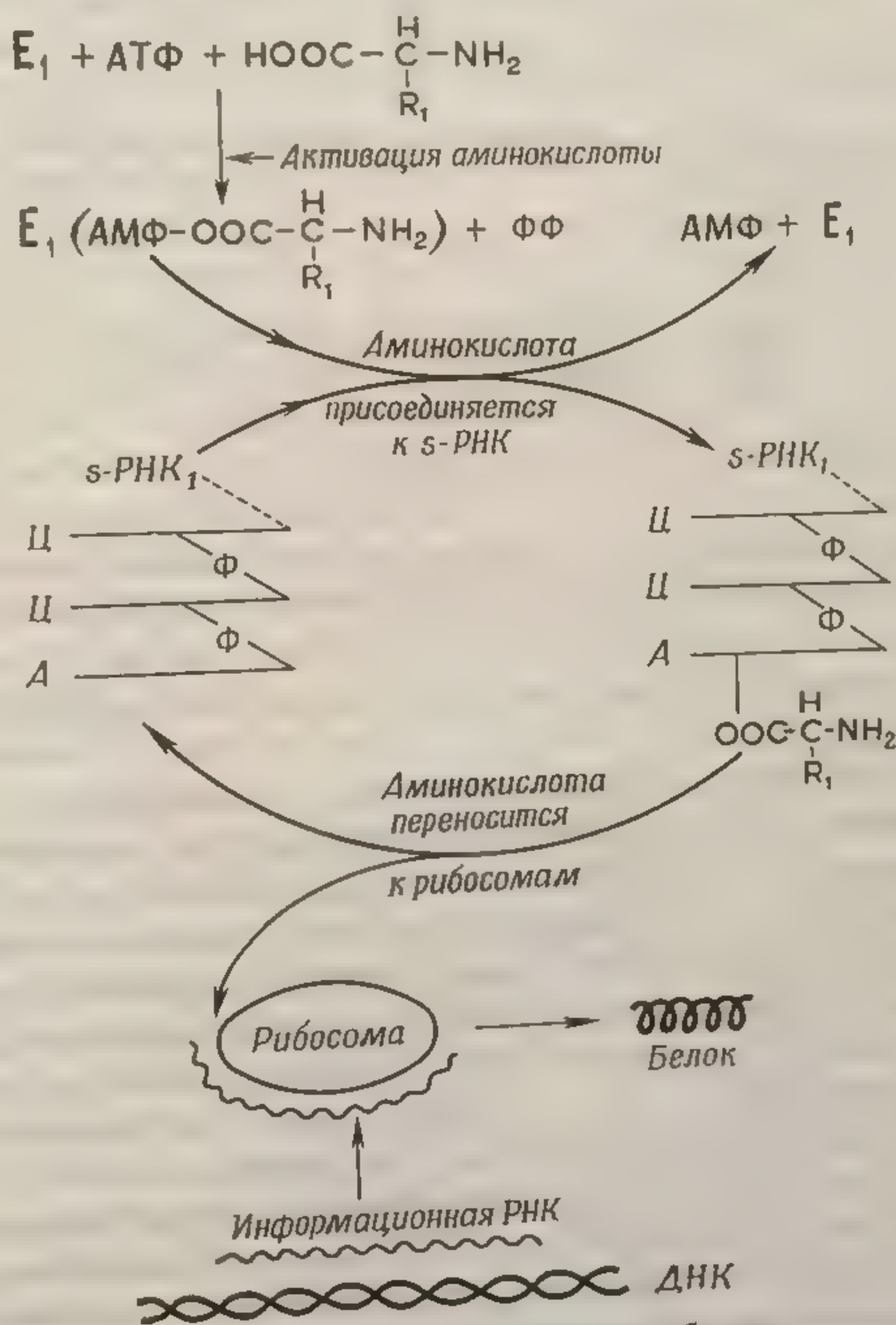
Активированная аминокислота прикрепляется к аденозину, расположенному на конце цепи *s*-РНК. Если, например, устранить эту возможность, обработав *s*-РНК перйодатом, то никакого прикрепления аминокислоты не произойдет. Поскольку для присоединения аминокислоты мононуклеотид на 2,3'-гидроксильном конце обязательно должен быть представлен адениловым остатком, можно утверждать, что аденин участвует в процессе этерификации. Стереохимические исследования показали, что между водородным атомом 2'-гидроксильной группы аденозина (но не 3'-ОН-группы) и N-3 пуринового кольца может возникнуть водородная связь. Тогда кислородный атом в 2'-ОН-положении станет более нуклеофильным, чем кислород в 3'-ОН-положении, и сможет вызвать нуклеофильную атаку карбонильного атома углерода аминоациладенилата, что приведет к образованию аминоацилэфира [3]. Следовательно, скорее всего аминокислота прикрепляется к 2'-ОН-группе, а не к 3'-ОН-группе концевго аденозина *s*-РНК, хотя нельзя исключить последующего ее перехода в 3'-положение. Действительно, имеются данные о существовании равновесной смеси 2'- и 3'-аминоацилизомеров [196, 197].

По-видимому, для каждой аминокислоты существует по меньшей мере одна специфичная *s*-РНК. Методы фракционирования этих *s*-РНК описаны на стр. 41. В некоторых случаях (стр. 274) для данной аминокислоты известно несколько *s*-РНК; например, в *Escherichia coli* найдены по меньшей мере три лейцил-*s*-РНК [193].

Специфичность различных молекул *s*-РНК была продемонстрирована следующим образом: *s*-РНК, нагруженную цистеином, обработали никелем Ренея, в результате чего цистеин восстановился в аланин, будучи уже присоединенным к молекуле *s*-РНК (фиг. 91). Образовавшийся в результате комплекс *s*-РНК с аланином вел себя как комплекс *s*-РНК с цистеином, а не с аланином [47]. Объясняется это, по-видимому, тем, что поведение *s*-РНК при синтезе белка определяется не характером присоединенной



Фиг. 91. Восстановление цистеина, акцептированного своей специфической $s\text{-РНК}$, до аланина [47].



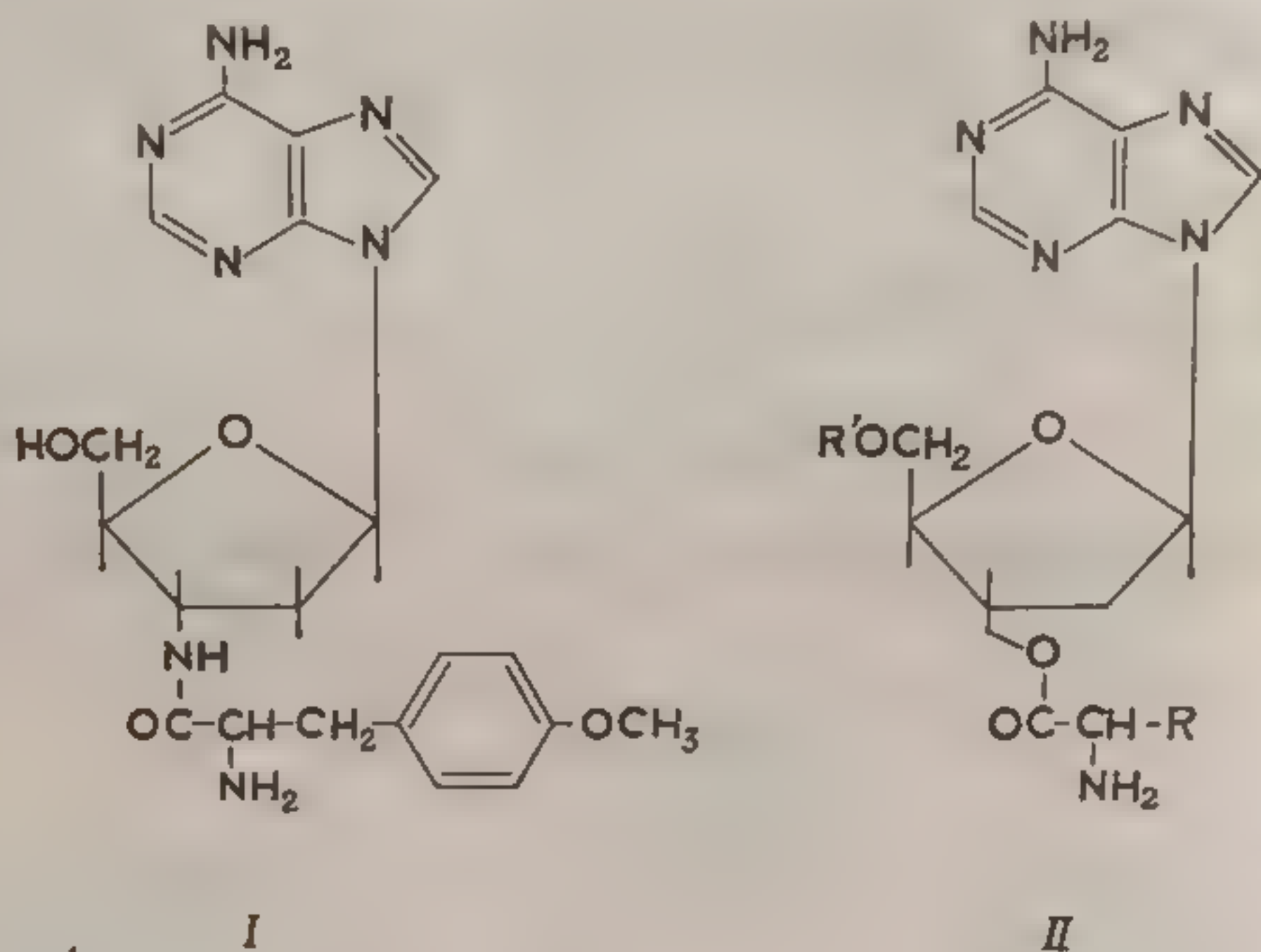
Фиг. 92. Этапы биосинтеза белка.
 E_1 — фермент, активирующий аминокислоту $\text{R}_1-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$.
 $s\text{-РНК}_1$ — транспортная РНК для этой аминокислоты.

кислоты, а последовательностью оснований, которая в данном случае была специфична для цистеина.

Функция *s*-РНК, таким образом, заключается в следующем. Она акцептирует активированную аминокислоту от аминоацил-аденилатного комплекса с образованием комплекса *s*-РНК — аминокислота:



Такие комплексы *s*-РНК с соответствующими им аминокислотами легко можно выделять, например, фенольным методом.



Фиг. 93. Сравнение структур пуромидина (I) и концевго аденозина транспортной РНК, несущей аминокислоту (II).

Вероятно, в живых клетках все или почти все *s*-РНК насыщены аминокислотами.

Затем *s*-РНК приводит аминокислоту к рибосомам (фиг. 92). Здесь-то и происходит сам синтез пептидов при участии трансферазных ферментов. При этом молекулы *s*-РНК освобождаются и могут приступить к переносу новых аминокислот [13, 48—50]. Образующаяся полипептидная цепь затем выталкивается из рибосом, возможно, под влиянием ГТФ [51]. Таким образом, как предположили Хоглэнд и Крик, *s*-РНК действуют как *адапторы*, располагая аминокислоты в правильной последовательности, заданной *m*-РНК для образования пептидов.

Антибиотик пуромидин является ингибитором белкового синтеза [3, 52], действуя, возможно, как аналог комплекса аминоксил—*s*-РНК (фиг. 93). Другие антибиотики, например хлорамфеникол, тетрацилин и ауреомидин, также препятствуют переходу аминокислот из аминоксил—*s*-РНК-комплексов в полипептиды.

Информационная РНК и генетический код

Последовательность аминокислот в любом белке определяется последовательностью оснований в определенных участках ДНК той клетки, в которой данный белок продуцируется. Эта информация передается от ДНК на белоксинтезирующий механизм в рибосомах с помощью информационной РНК. Однако в белках, как известно, обычно присутствует двадцать различных аминокислот, тогда как в нуклеиновых кислотах имеется только четыре основных типа нуклеотидов. С помощью *генетического кода* последовательность из 20 или более единиц одного типа зашифровывается последовательностью из четырех единиц другого типа (см. обзоры [53—63, 132, 177, 208]).

Поскольку имеется всего четыре вида оснований, а аминокислот — двадцать видов, то простого соотношения 1:1 между ними быть не может. Даже если бы каждая аминокислота кодировалась сочетанием из двух нуклеотидов, то и в этом случае число возможных сочетаний (4^2) составило бы только 16 и, следовательно, было бы недостаточно для кодирования двадцати аминокислот.

Поэтому было высказано предположение, что каждая аминокислота определяется сочетанием по меньшей мере из трех нуклеотидов, которые могут дать 64 комбинации ($4^3 = 64$), что более чем достаточно для кодирования двадцати аминокислот. Крик и его сотрудники [54—56] привели весьма веские доводы в пользу триплетной теории и доказали, что участок полинуклеотида, названный ими *кодоном*, состоит из трех оснований. Их эксперимент был проведен на А- и В-цистромах локуса r_{11} бактериофага Т4. Как показал Бензер с помощью тщательно составленной генетической карты фага Т4, от одного определенного участка ДНК зависит, сможет или нет фаг заразить К-штамм *Escherichia coli*. Крик и его сотрудники использовали профлави́н (стр. 221), чтобы добиться делеции (выпадения) одного основания или, наоборот, вставки дополнительного основания в ДНК.

Предположим, что в определенном участке ДНК последовательность оснований такова, какой мы ее изобразили в верхней строке на фиг. 94. Допустим далее, что информация считывается слева направо, начиная с первого Ц, и что основания сгруппированы, как мы говорили раньше, по три. Тогда вызванное мутагеном профлавином выведение второго Т слева нарушит считывание всех триплетов, расположенных вправо от места делеции (фиг. 94, вторая строка). Полученный таким путем мутант будет сильно дефектным и не сможет заразить штамм К. Однако если провести новую мутацию и вставить при этом другое основание Х в третий триплет слева, то четвертый, пятый и последующие триплеты будут считываться правильно и нарушенными окажутся

только второй и третий триплеты (фиг. 94, третья строка). Только две аминокислоты, соответствующие этим двум триплетам, окажутся «неверными». Если присутствие этих двух «посторонних» аминокислот не изменит заметно структуру белка, то фаг будет вести себя обычно и заражать штамм К. На практике было действительно обнаружено, что фаг ведет себя нормально, если вставка и делеция расположены близко друг от друга. По мере увеличения расстояния между вставкой и делецией «аномалия» фага становится более отчетливой.

	ЦАТ	ЦАТ	ЦАТ	ЦАТ	ЦАТ	ЦАТ...
-1	ЦАТ	ЦАЦ	АТЦ	АТЦ	АТЦ	АТ...
-1 +1	ЦАТ	ЦАЦ	АХТ	ЦАТ	ЦАТ	ЦАТ...
+3	ЦАХ	ТХЦ	АТХ	ЦАТ	ЦАТ	ЦАТ...

Фиг. 94. Гипотетическая последовательность оснований в ДНК, показывающая, что генетическая информация записана триплетами. При выпадении одного основания (вторая строка) считывание кода нарушается. Считывание кода может быть восстановлено, если где-то поблизости от выпавшего основания включится новое основание (третья строка). Информацию можно прочесть и в том случае, если включится целых три основания (нижняя строка).

Мутанты можно комбинировать и по-другому. Если получить две «плюс»-мутации, то фаг окажется дефектным. Если же получить три «плюс»- или три «минус»-мутации, то фаг ведет себя обычным образом и заражает штамм К (фиг. 94, нижняя строка).

Описанные результаты легче всего интерпретировать, предположив, что в генетическом коде роль кодирующих единиц выполняют последовательно расположенные триплеты. Вставка одного или двух оснований в любом месте так сильно изменит сочетание в триплетах, что сделает код несчитываемым. Если же в молекулу включатся три основания или одно основание включится, а другое выпадет, то последовательность в триплетах, расположенных за двумя поврежденными триплетами, восстановится и информация будет считываться с ДНК, как прежде.

Справедливость триплетной теории была доказана в результате опытов [64], показавших, что в полисоме (стр. 281) отрезку формирующейся полипептидной цепи гемоглобина, содержащему 30 аминокислот, соответствует участок *m*-РНК длиной в 90 нуклеотидов. Точно такое же отношение, равное трем, было получено в генетических экспериментах, в которых удалось измерить на генетической карте длину определенного участка ДНК и сопоставить ее с длиной полипептидной цепи, соответствующей измеренному участку ДНК.

Были получены затем и другие данные [136], подтверждающие, что величина кодирующей единицы равна трем, а не числу,

кратному трем. Для этого использовали вирус некроза табака. Это очень мелкий вирус (из числа так называемых вирусов-сателлитов), и его РНК содержит всего 1 200 нуклеотидов. Белковая субъединица этого вируса состоит из 372 аминокислотных остатков (величина, очень близкая к 400), чего и следовало бы ожидать, если кодирующий участок действительно представляет собой триплет.

Следующая проблема заключалась в том, чтобы определить соответствие триплетов индивидуальным аминокислотам. Она была решена на белоксинтезирующих системах из бесклеточных экстрактов, выделенных из *Escherichia coli* [75, 173, 174]. В них содержатся рибосомы, транспортные РНК, аминоацил-s-РНК-синтетазы и другие ферменты, а также ДНК и *m*-РНК. После добавления АТФ, ГТФ, K^+ , Mg^{2+} и аминокислот, меченных по углероду, аминокислоты легко включаются в кислотонерастворимый белок, о чем говорит увеличение его радиоактивности.

Если ДНК в такой системе разрушить ДНК-азой, то синтез белка прекратится, как только будет израсходована *m*-РНК. Однако синтез белка можно восстановить, если добавить в систему РНК из различных источников или даже синтетические полинуклеотиды, образованные с помощью полинуклеотид фосфорилазы.

В 1961 г. Ниренберг и Маттеи [173] сделали очень важное наблюдение: если к системе, содержащей смесь 20 аминокислот, добавить синтетический полимер поли-У, то только одна аминокислота, а именно фенилаланин, включается в кислотонерастворимый белковоподобный полимер, который при идентификации оказался полифенилаланином. Следовательно, фенилаланин закодирован в РНК сочетанием УУУ.

Этот способ изучения кода был продолжен затем Ниренбергом и его сотрудниками, Очоа и его сотрудниками и другими исследователями, получившими много ценных сведений. Например, было показано, что поли-А направляет синтез полилизина, а поли-Ц способствует включению пролина в кислотонерастворимый материал.

При инкубации химически синтезированного олигодезокситимидилата длиной в 6—14 нуклеотидов и АТФ в присутствии РНК-полимеразы и белоксинтезирующей бесклеточной системы из *Escherichia coli* удалось продемонстрировать синтез полилизина [175].

Для изучения кода широко используются синтетические сополинуклеотиды. Поли-(А, У), например, стимулирует включение фенилаланина, изолейцина, лейцина и тирозина, а поли-(У, Г) — фенилаланина, цистеина, валина, глицина и триптофана. Поли-(У, Г, Ц) способствует включению аргинина, а поли-(У, Г) таким свойством не обладает. Следовательно, аргинин кодируется триплетом, содержащим У, Ц и Г.

Более того, соотношение оснований в сополимерах определяет количественные соотношения между включаемыми аминокислотами. Например, можно принять, что количество триплетов УУУ в поли-(У, Г) с соотношением оснований У : Г — 5,1 составляет 100%. Тогда каждый из триплетов с одним Г и двумя У (УУГ, УГУ, ГУУ) будет встречаться в 20% случаев, а каждый из триплетов с одним У и двумя Г (УГГ, ГУГ, ГГУ) — только в 4% случаев. Триплетов ГГГ не будет совсем.

Такой поли-(У, Г) способствует включению фенилаланина, цистеина, валина, глицина и триптофана в соотношениях 100 : 20 : 20 : 4 : 5 соответственно. Отсюда можно заключить, что и цистеин и валин зашифрованы триплетами, состоящими из двух У и одного Г, а глицин и триптофан — триплетами из одного У и двух Г. Аналогичные эксперименты были проведены с поли-(А, Ц) и поли-(Ц, Г).

На основании такого рода опытов стало возможным для каждой аминокислоты установить состав (но не последовательность) кодирующего ее триплета [61]. Ниже приведены триплеты оснований в *m*-РНК, соответствующие отдельным аминокислотам [61]

Аминокислота	Триплеты кода (порядок внутри триплета произволен)
Аланин	ЦАГ, ЦЦГ, ЦУГ
Аргинин	ГАА, ГЦЦ, ЦУГ
Аспарагин	ЦАА, ЦУА, УАА
Аспарагиновая кислота	ГЦА, ГУА
Цистеин	ГУУ
Глутаминовая кислота	ААГ, АУГ
Глутамин	ААЦ, УАЦ
Глицин	ГАГ, ГЦГ, ГУГ
Гистидин	АЦЦ, АУЦ
Изолейцин	ААУ, ЦАУ, УУА
Лейцин	ЦЦА, УАУ, УГУ, УУЦ
Лизин	ААА, АУА
Метионин	АГУ
Фенилаланин	УЦУ, УУУ
Пролин	ЦАЦ, ЦЦЦ, ЦУЦ
Серин	АЦГ, ЦУУ, УЦЦ
Треонин	АЦА, ЦЦА, УЦА
Триптофан	УГГ
Тирозин	АЦУ, АУУ
Валин	УУГ

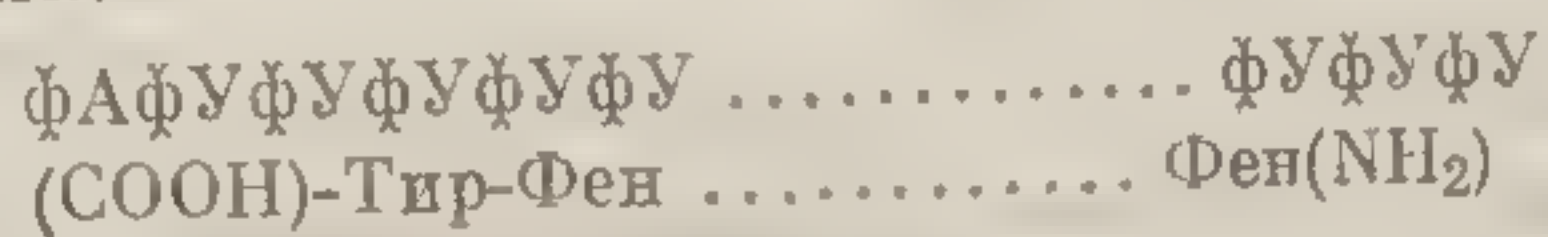
Как видно из приведенного перечня, некоторые аминокислоты кодируются несколькими триплетами.

Из 64 возможных триплетов две трети уже определены. Это означает, что одна аминокислота может быть зашифрована более чем одним триплетом. Такой код называется *вырожденным*. При вырожденном коде одной аминокислоте может соответствовать

несколько s-РНК. Так в действительности и оказалось (стр. 268). Например, из *Escherichia coli* были выделены две или даже три различные s-РНК, акцептирующие лейцин [65—68, 193].

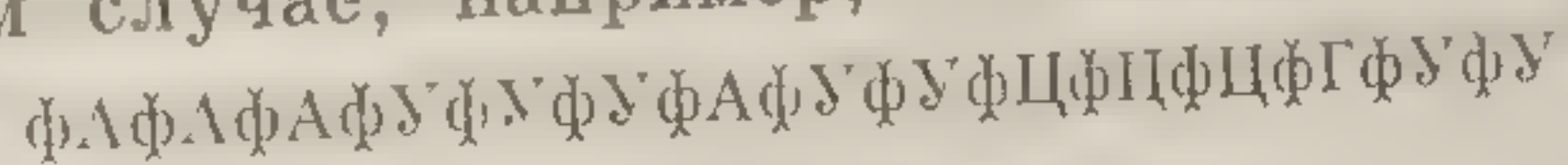
Определить порядок оснований в триплете — задача нелегкая. Один из подходов заключается в следующем [61]. В качестве затравки для полинуклеотидфосфорилазы используют динуклеотид фАфУ, а в качестве субстрата — УДФ. Полученный полимер фАфУфУфУ...фУфУ содержит на одном конце цепи триплет АУУ. В белоксинтезирующей бесклеточной системе этот полимер образует продукт, состоящий преимущественно из фенилаланина с небольшой примесью тирозина. Следовательно, тирозин кодируется триплетом АУУ в указанной последовательности. Точно таким же путем можно показать, что триплетом для цистеина является последовательность ГГУ.

Далее, если в качестве носителя информации использовать полимер фАфУфУфУ...фУфУ, то в образовавшемся полипептиде на N-конце находится остаток фенилаланина, а на С-конце — остаток тирозина:

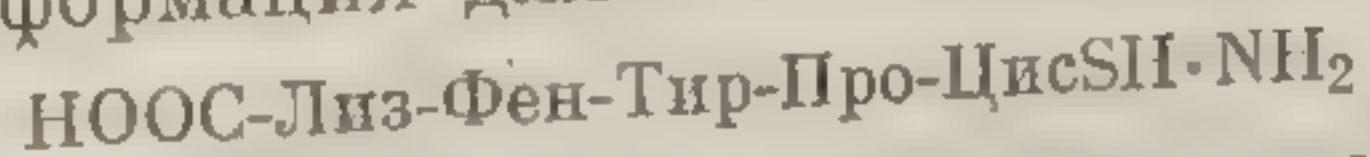


Поскольку синтез белков протекает в направлении от N-конца к С-концу, т. е. в нашем случае справа налево, то и считывание кода в приведенном выше «информационном» полинуклеотиде протекает справа налево.

В частном случае, например, в последовательности *m*-РНК



закодирована информация для полипептида



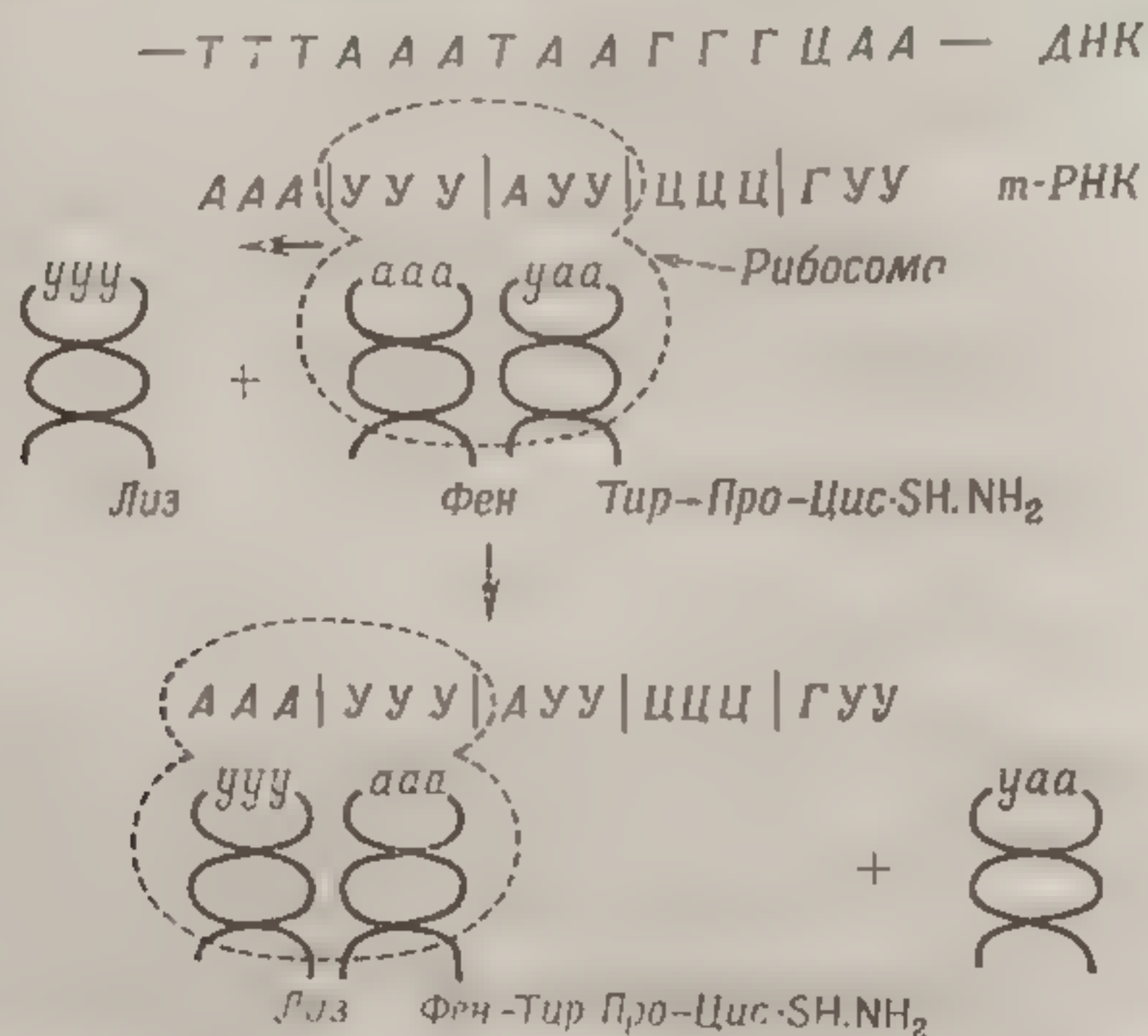
Такая *m*-РНК должна образовываться на участке цепи ДНК с последовательностью оснований



если исходить из предположения, что только одна из двух цепей ДНК кодирует синтез *m*-РНК (стр. 236). Механизм образования такого полипептида показан на фиг. 95.

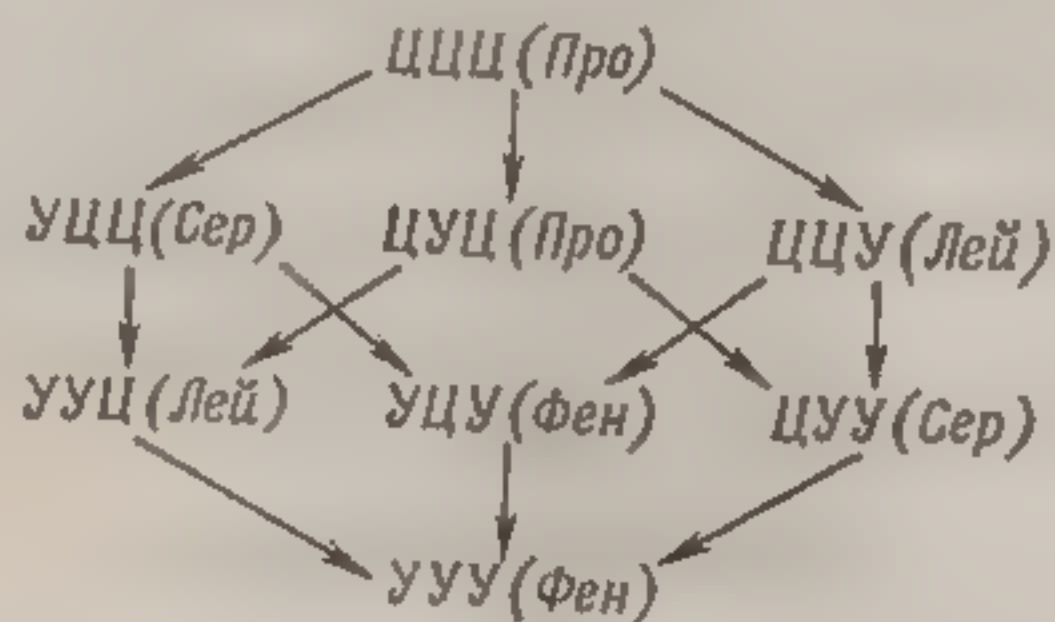
На искусственно индуцированных мутантах вируса табачной мозаики (ВТМ) были получены данные, подтверждающие существование триплетного кода [71, 72, 195]. Если обработать азотистой кислотой РНК из ВТМ, то в строении вирусной РНК произойдут следующие изменения [71, 72]: во-первых, цитозин дезаминируется в урацил (Ц → У), а аденин дезаминируется в гипоксантин, который в коде ведет себя как гуанин (А → Г). Обработав такой РНК зараженные растения, можно получить мутанты вируса, у кото-

рых в белке замещена одна-единственная аминокислота, причем в каждом случае замена аминокислоты в полипептидной цепи оказывается связанной с заменой $A \rightarrow G$ или $C \rightarrow U$ полинуклеотидной цепи (фиг. 96). Например, серин может быть замещен на



Фиг. 95. Механизм образования пептида на участке *m*-РНК, в котором при чтении справа налево зашифрованы цистин, пролин, тирозин, фенилаланин и лизин.

фенилаланин в соответствии с изменением $ЦУУ \rightarrow УУУ$ или же место аспарагиновой кислоты может быть занято глицином в связи с заменой $ГЦА \rightarrow ГЦГ$.



Фиг. 96. Этапы возможного превращения триплета ЦЦЦ в триплет УУУ путем дезаминирования. Аминокислоты, соответствующие каждому триплету, показаны справа от кодона в скобках.

Иной подход к проблеме кода заключается в измерении минимальной длины олигонуклеотида, способного направлять связывание C^{14} -аминоацил-*s*-РНК с рибосомами [185, 192, 207, 209]. Например, триплектоиды фУфУфУ, фАфАфА и фЦфЦфЦ направляют присоединение фенилаланин-, лизин- и пролин-*s*-РНК соответственно. Динуклеотиды не оказывают никакого действия.

Тринуклеотиды с концевым фосфатом в положении 5' гораздо активнее, чем тринуклеотиды без концевых фосфатов; тринуклеотиды с 2'(3')-концевым фосфатом совершенно неактивны. Тринуклеотид ГфУфУ обеспечивает связывание валил-s-РНК с рибосомами, а тринуклеотиды УфГфУ и УфУфГ оказались неактивными. Следовательно, валин кодируется триплетом ГУУ [185].

В настоящее время считают установленным, что код универсален, т. е. что один и тот же код действует у всех живых существ [53, 191]. Например, гемоглобин можно синтезировать в системе, содержащей s-РНК из *E. coli* и рибосомы из ретикулоцитов кролика [69, 70].

Из приведенного материала явствует, что синтез специфического белка можно продемонстрировать в опытах *in vitro*. Однако опубликованные данные о таком синтезе немногочисленны [12, 73—76, 124]. Чаще всего ссылаются на синтез в бесклеточной системе гемоглобина, белков чехла фага, β-галактозидазы, дифтерийного токсина, триптофансинтетазы, α-амилазы и запасного глобулина семян гороха. Один из самых интересных примеров синтеза специфического белка обнаружен у личинки синей мухи *Calliphora erythrocephala*, у которой под действием особого гормона, экдизона, на хромосомах слюнных желез образуются вздутые участки, называемые пуффами (стр. 239). Считают, что гормон этот активирует специфические локусы гена, в результате чего на цепях ДНК пуффа образуется специфическая *m*-РНК.

Одно из основных физиологических воздействий экдизона заключается в том, что он вызывает линьку куколки, в течение которой белая мягкая кожица личинки превращается в плотный ложный кокон. Механизм этого процесса включает также сдвиг в метаболизме тирозина, который приводит к синтезу N-ацетилдопамина. N-ацетилдопамин образуется при участии ДОФА-декарбоксилазы — фермента, отсутствующего на предшествующем (личиночном) этапе. Было показано, что РНК, выделенная из белой предкуколки, т. е. на стадии непосредственно перед окукливанием, индуцирует образование ДОФА-декарбоксилазы в белоксинтезирующей системе, в то время как РНК из более молодых (семидневных) личинок не оказывает такого действия [182, 187].

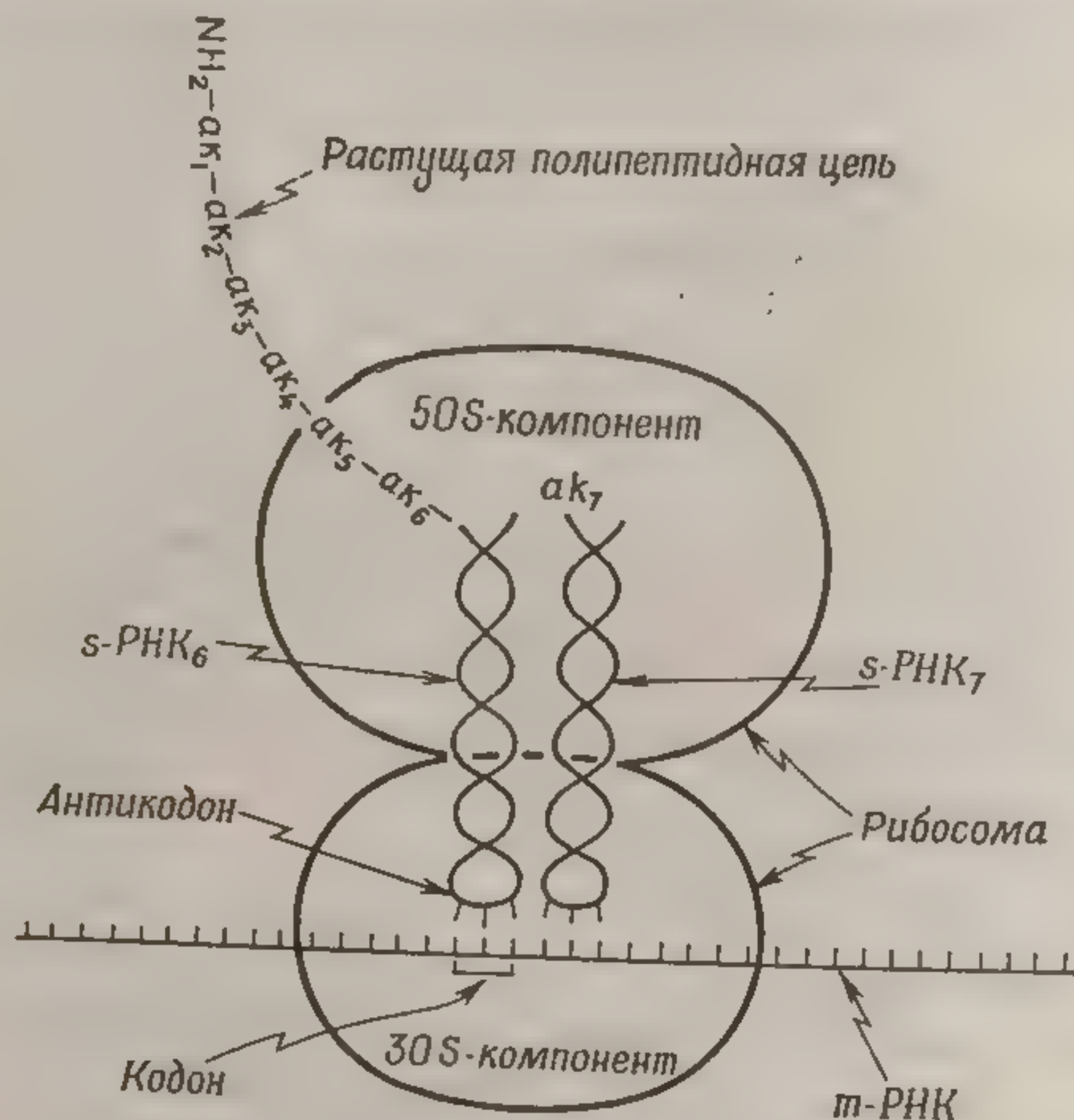
Данные о коллинеарности между последовательностью генов и аминокислот мы рассмотрим в гл. XV [77, 78].

Трансляция информации в рибосомах

Мы уже говорили о том (стр. 243), что *m*-РНК, образовавшись на ДНК, передвигается к рибосомам и соединяется с 30S-компонентами рибосом. Одновременно к рибосомам направляются и молекулы s-РНК, нагруженные соответствующими аминокислотами.

Каждая из рибосом имеет на своей 50S-субъединице [131] по одной «посадочной площадке» для двух молекул *s*-РНК [79, 183] (фиг. 97). Именно в рибосомах аминокислоты образуют полипептидную цепь, присоединяясь одна к другой в правильной последовательности, определяемой той генетической информацией, которая записана в молекуле *m*-РНК.

Полипептидные цепи растут путем последовательного присоединения отдельных аминокислот, начиная с N-конца [12, 80]. Своим



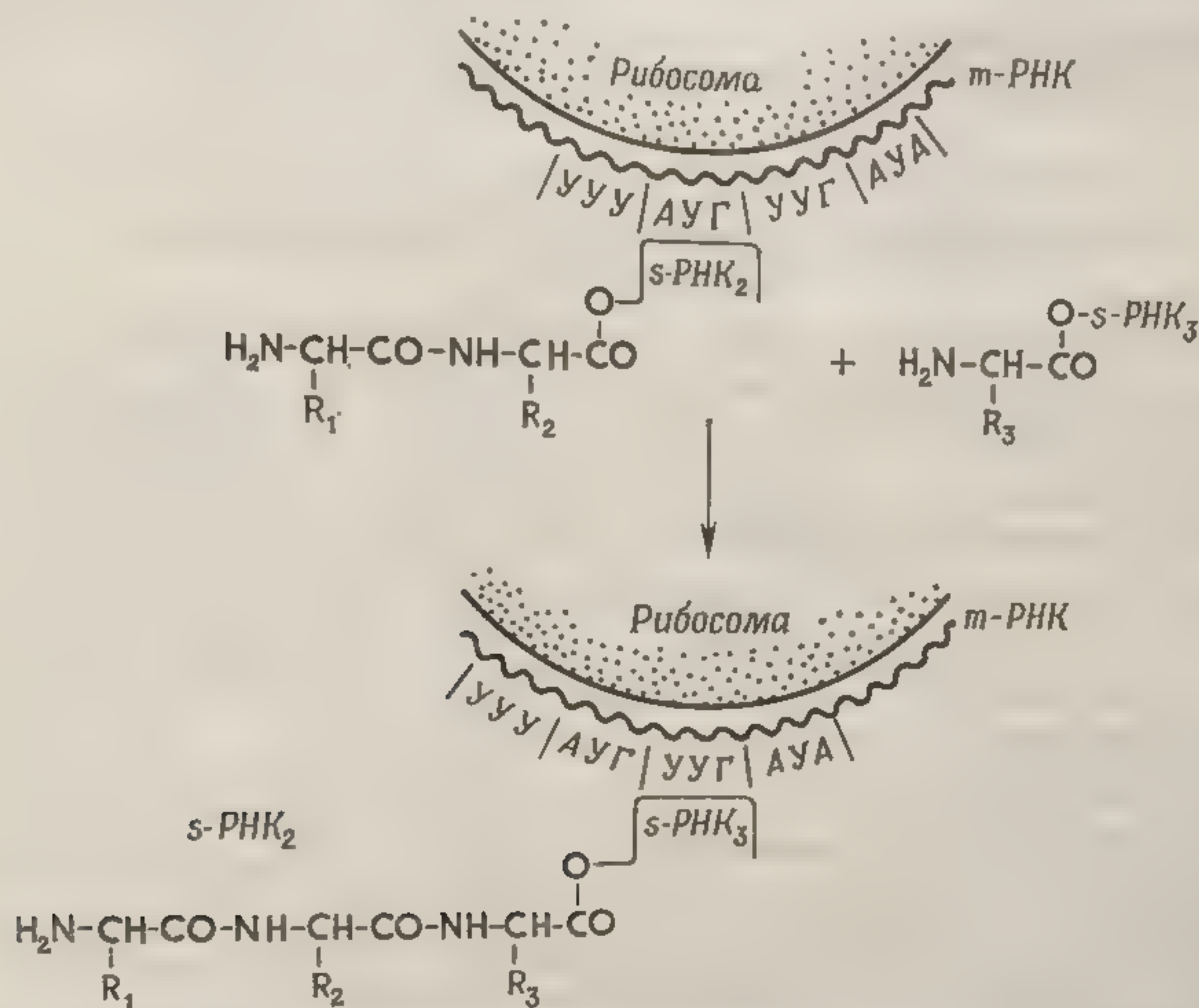
Фиг. 97. Схематическое изображение рибосомы с цепью *m*-РНК и двумя молекулами *s*-РНК.

К левой *s*-РНК (*s*-РНК₆) прикреплена растущая полипептидная цепочка из 6 аминокислот. Седьмая аминокислота αK_7 прикреплена к своей *s*-РНК₇, расположенной вдоль *s*-РНК₆. Когда αK_7 присоединится к полипептидной цепи, *s*-РНК₇ передвинется влево и будет удерживать выросшую на одно звено полипептидную цепь; в это время новая *s*-РНК займет позицию справа (по Уотсону).

карбоксильным концом растущая цепь прикреплена к молекуле *s*-РНК, которая присоединяет ее к рибосоме (фиг. 98). При обработке детергентами рибосомный компонент отделяется от остальной части комплекса; белок + *s*-РНК можно выделить центрифугированием в градиенте плотности или на колонке из сефадекса. Затем действием слабой щелочи можно отщепить *s*-РНК от молекул белка.

Чтобы проследить, как прикрепляется растущая полипептидная цепь к *s*-РНК, были поставлены опыты с *s*-РНК, меченой C^{14} по коцевому аденозину. Для получения такой РНК от обычной

s-РНК отделяют концевой аденозин с помощью периодата (стр. 52); оставшийся фосфатный остаток удаляют щелочной фосфатазой; затем полученный препарат в соответствующих условиях обрабатывают C^{14} -АТФ таким образом, чтобы меченый аденозин включился в концевое положение *s*-РНК. Далее такую

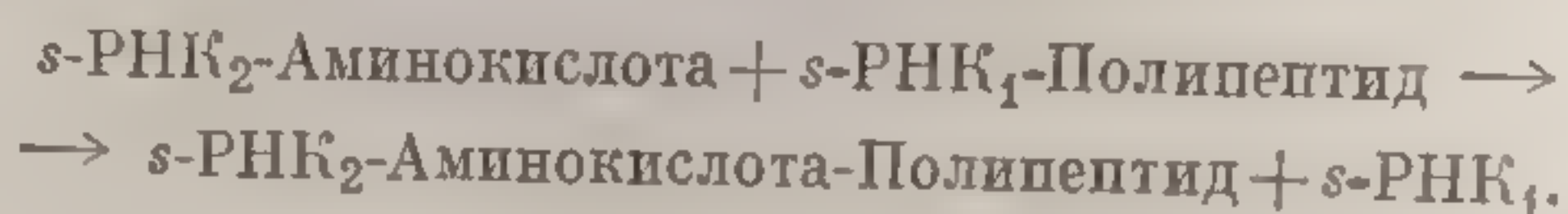


Фиг. 98. Растущая полипептидная цепь прикреплена своим карбоксильным концом к молекуле *s*-РНК, которая присоединяет ее к рибосоме и одновременно взаимодействует с соответствующим кодоном *m*-РНК. В нашем примере под аминокислотами, несущими R_1 , R_2 , R_3 и R_4 , имеются в виду фенилаланин, глутаминовая кислота, валин и лизин.

s-РНК используют для образования полилизина в белоксинтезирующей системе, содержащей лизин, меченный тритием, и поли-А в качестве источника информации. После определенного периода инкубации экстрагируют фенолом *s*-РНК с прикрепленным к ней полилизин и обрабатывают этот комплекс рибонуклеазой. Выделенный лизиновый полипептид содержит некоторое количество меченого аденозина, который может быть отщеплен с помощью щелочи [81].

В любой момент времени функционирующая рибосома содержит только одну синтезируемую полипептидную молекулу, прикрепленную своим карбоксильным концом к молекуле *s*-РНК, которая в свою очередь прикреплена к определенному участку 50S-субъединицы [131].

Эта молекула *s*-РНК освобождается и переходит в свободное состояние (фиг. 97), когда следующая по порядку аминокислота (прикрепленная к «своей» *s*-РНК, которая уже «сидит» на 50S-рибосоме) соединяется с карбоксильным концом цепи, образовав пептидную связь с помощью соответствующего фермента. Теперь уже другая молекула *s*-РНК, та, которая «привела» эту новую концевую аминокислоту, удерживает на рибосоме удлинившуюся на одно звено полипептидную цепь [82—84]:



Пока еще никто не знает, каким способом аминоацил-*s*-РНК вступает в контакт с полисомным комплексом. Предполагают, что рибосома движется над матрицей *m*-РНК таким образом, чтобы поставить следующий триплет нуклеотидов *m*-РНК в положение, при котором *m*-РНК может отобрать следующую аминокислоту, соединившись с комплементарным триплетом соответствующей *s*-РНК. Рибосома соединяется с *m*-РНК своей 30S-субъединицей, на которой имеется специфический участок (своего рода «посадочная площадка»), содержащий 27 нуклеотидов [115]. В какой степени рибосомная РНК связана с этими «посадочными площадками», еще не установлено [176]. Однако существует предположение [167], что ионы магния образуют мостики между *r*-РНК-компонентами рибосом и комплексом *s*-РНК—*m*-РНК и что основная функция *r*-РНК-компонента рибосом состоит в том, чтобы обеспечить подходящую трехмерную поверхность, по которой *m*-РНК могла бы скользить вдоль полирибосом.

Предложенный механизм не может дать ответа на несколько вопросов. Хотя предшествующие работы ясно показали, что *m*-РНК тесно связана с рибосомами [85], трудно представить себе, каким образом длинная тонкая нить *m*-РНК (длиной по меньшей мере 1500 Å) может передавать информацию о последовательности своего строения на тот участок рибосомы, на котором растет полипептидная цепь. Сейчас уже известно, что молекула *m*-РНК в действительности включается в структурное образование из нескольких рибосом, названное *полисомой*, или *полирибосомой* [86—89], или же *эргосомой* [50, 64, 90—92].

Полисомы были впервые обнаружены в ретикулоцитах кролика, участвующих в синтезе гемоглобина [64, 79, 86, 87, 93—95, 178]. Если осторожно разрушить оболочки ретикулоцитов, меняя осмотическое давление раствора, то полисомы высвобождаются в виде комплекса с коэффициентом седиментации 170S; по-видимому, они состоят из пяти рибосом на нити *m*-РНК. Этот комплекс можно обнаружить с помощью электронного микроско-

па [96]. Мягкая обработка рибонуклеазой приводит к разрушению нити РНК, освобождая при этом обычные отдельные рибосомы.

Аналогичные полисомные агрегаты были обнаружены в целом ряде тканей; например, комплексы, содержащие до 40 рибосом каждый, обнаружены у *E. coli* [82, 83, 92, 97, 98]; в печени найдены комплексы, содержащие до 20 рибосом [50, 90, 184].

Полисомы активнее участвуют в синтезе полипептидов, чем отдельные рибосомные мономеры. Об этом можно судить по включению меченых аминокислот в систему, содержащей, например, синтетическую *m*-РНК в виде поли-У, которая обеспечивает специфическое включение фенилаланина в полипептид. Уже образовавшие агрегат рибосомы невосприимчивы к добавленной поли-У, а мономеры с готовностью акцептируют поли-У и образуют быстро осаждающийся комплекс, обладающий белоксинтезирующей активностью, о чем говорит включение C^{14} -фенилаланина [82, 83, 93].

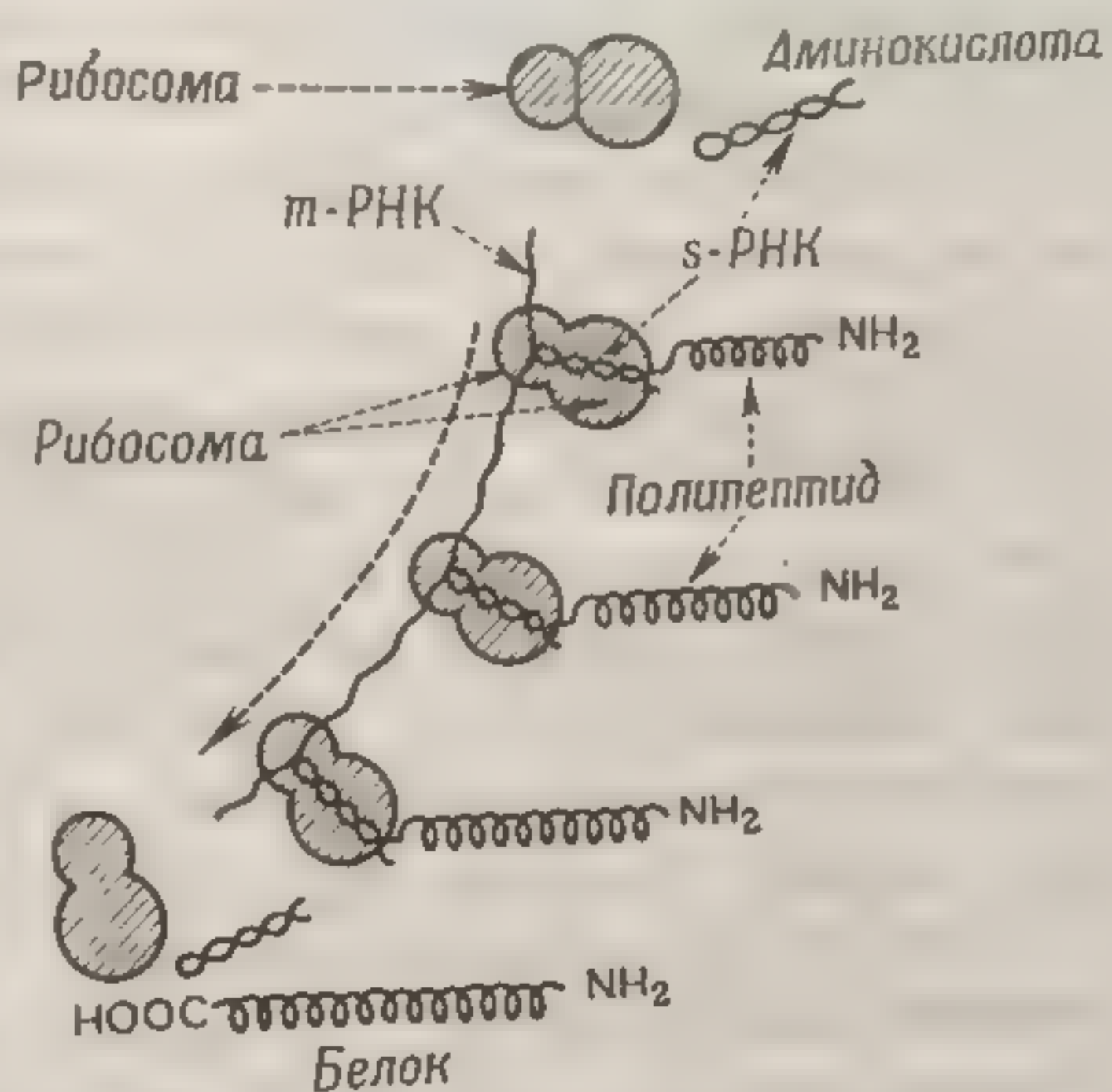
Рассмотрим фиг. 99, на которой изображена группа из 5 или более рибосом, нанизанных на нить *m*-РНК. Рибосомы начи-

нают синтез белка, прикрепившись к одному концу цепи *m*-РНК. По мере того как рибосомы передвигаются вдоль цепи, они все больше вытягивают полипептидную цепочку. Достигнув конца цепи, они отделяются от *m*-РНК сами и одновременно снимают с цепи синтезированный полипептид. Теперь рибосомы снова свободны и могут начинать новый синтез белка.

Индукированные ферменты также образуются на полисомах. Например, полисома, синтезирующая β -галактозидазу у *E. coli*, содержит около 40 рибосом и одну цепь *m*-РНК с молекулярным весом $1,3 \cdot 10^6$ [98, 99].

Полисомный механизм обеспечивает участие одной молекулы *m*-РНК в образовании нескольких белковых молекул до того, как *m*-РНК разрушится [100].

Теперь уже не вызывает удивления, что в клетках так мало *m*-РНК. Если бы с каждой 70S-рибосомой соединялась одна моле-



Фиг. 99. Схематическое изображение полисомы.

Видно, как три рибосомы, передвигаясь вдоль цепи *m*-РНК, по мере своего продвижения удлиняют синтезируемый полипептид. Рибосома, расположенная слева внизу, только что отсоединилась от *m*-РНК, закончив синтез соответствующего белка. Верхняя рибосома вот-вот вступит в контакт с *m*-РНК.

кула информационной РНК с молекулярным весом 500 000, то содержание *m*-РНК в клетке составляло бы 25% всей клеточной РНК. Если же каждая молекула *m*-РНК связывает одновременно 4—8 рибосом, то только 3—6% общей РНК придется на долю *m*-РНК [82, 83]. Именно такой порядок величин и был обнаружен в действительности. О том, что рибосомы каким-то образом участвуют в механизмах считывания генетической информации, особенно отчетливо говорят данные, полученные о так называемой *неоднозначности* кода. Мы имеем в виду способность триплетов кодировать более чем одну аминокислоту. Например, поли-У способствует включению в бесклеточной системе не только фенилаланина, но и небольших количеств лейцина [173, 191, 206]. При этом доля включившегося лейцина составляет всего лишь 6% от всей массы включенного фенилаланина, однако при понижении температуры эта величина возрастает [190]. В присутствии антибиотиков синтетические полинуклеотиды могут кодировать не только «привычные» аминокислоты, но и остальные [116]. В присутствии стрептомицина, например, поли-У кодирует не только фенилаланин, но также и серин, лейцин и изолейцин. Поскольку этот эффект не обнаруживается на рибосомах, выделенных из устойчивых к стрептомицину клеток, можно думать, что антибиотики настолько изменяют рибосомы, что ослабевает специфичность считывания кода.

Мы уже обсуждали ранее вопрос о разобщенности процессов транскрипции и трансляции, т. е. о том, что *m*-РНК отделяется от матрицы ДНК и мигрирует в другую часть клетки для осуществления белкового синтеза. Однако не исключено, что процессы эти не обязательно должны быть разобщены, т. е. синтез белка может идти, пока *m*-РНК еще остается прикрепленной к гену. Такой процесс вполне возможен у бактерий или у многоклеточных животных, клетки которых имеют ядерные рибосомы. Эта точка зрения получила подтверждение в опытах с бесклеточной системой, в которой ДНК присоединяется к рибосомам с помощью *m*-РНК [198].

Давайте посмотрим теперь, каким образом может быть нарушен нормальный ход процесса. Проще всего проследить это на примере синтеза глобина у различных форм гемоглобина [101, 117, 188]. Возможно, в определенном участке ядерной ДНК, в котором контролируется образование гемоглобина [101, 117, 188], происходит очень незначительное изменение, т. е. всего лишь в одном триплете тимин (Т) замещается на аденин (А). Это изменение передается по наследству. Оно вызывает небольшое нарушение в строении *m*-РНК, в результате чего в цепи из 287 аминокислот в одном месте валин замещает глутаминовую кислоту (фиг. 100). Такая незначительная замена настолько сильно

изменяет свойства гемоглобина, что эритроциты, обычно круглые при низком давлении кислорода, становятся серповидными. Люди с подобной аномалией страдают от серьезной болезни, известной под названием серповидноклеточной анемии. В гемоглобине (HbS) таких больных валин действительно занимает место, в котором в нормальном гемоглобине (HbA) находится глутаминовая аминокислота. Эта замена связана с заменой Т на А в соответствующем месте молекулы ДНК (фиг. 100).

ДНК	Т Г Т Г Г Г Т А Ц Т А Ц Т Т Т	} Кодирование нормального гемоглобина
m-РНК	АЦА ЦЦЦ АУГ АУГ ААА	
HbA	Тре — Про — Глу — Глу — Лиз	
ДНК	Т Г Т Г Г Г А А Ц Т А Ц Т Т Т	} Кодирование аномального гемоглобина
m-РНК	АЦА ЦЦЦ УУГ АУГ ААА	
HbS	Тре — Про — Вал — Глу — Лиз	

Фиг. 100. Последовательность оснований в участке ДНК и соответствующих m-РНК, участвующих в синтезе гемоглобинов А и S.

Видно, что средняя глутаминовая кислота в гемоглобине А заменена на валин в гемоглобине S.

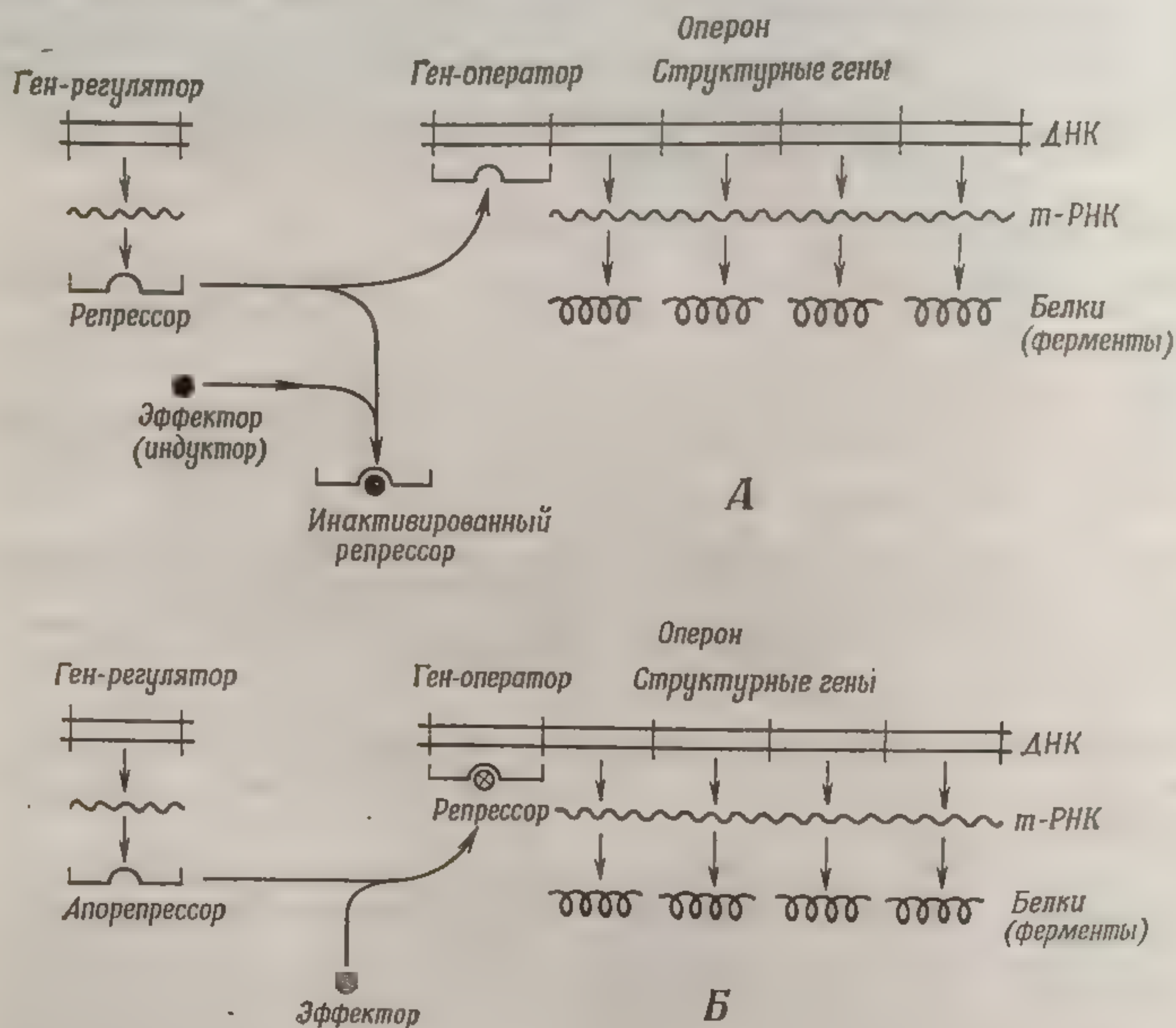
Можно думать, что талассемия [172] возникает из-за образования неправильной m-РНК, участвующей в синтезе гемоглобина [101].

Сейчас известно уже несколько такого рода нарушений, называемых молекулярными болезнями [188]; причина таких заболеваний заключается в наследуемой ошибке в строении молекулы ДНК. Некоторые из них приводят к нарушениям обмена веществ, так как сопровождаются синтезом «поврежденных» ферментов, которые не могут обеспечить правильного протекания какого-то метаболического процесса. Приведенная концепция была предложена в 1909 г. Гэрродом, когда он опубликовал свою ставшую ныне классической книгу «Врожденные ошибки метаболизма».

Регуляция белкового синтеза

Нам следует обсудить теперь еще один вопрос. Мы до сих пор еще не в состоянии объяснить, почему же клетка не производит непрерывно все те белки, включая ферменты, которые она может делать. Некоторые ферменты образуются только тогда, когда появляется потребность в них. По общему мнению, большая часть ДНК в обычных условиях «закрыта», т. е. не работает. Весьма привлекателен предложенный Жакобом и Моно вероятный механизм регулирования синтеза ферментов [102—106] у бактерий. По их мнению, несколько структурных генов или цистронов, рас-

положенных рядом в молекуле ДНК и тесно сцепленных на генетической карте, образуют так называемый *оперон*. Оперон находится под контролем особого гена — *оператора*, тесно связанного по генетическому местоположению с опероном (фиг. 101).



Фиг. 101. Оперон.

А. Ген-регулятор образует репрессор, блокирующий ген-оператор и тем самым предотвращающий формирование *м-РНК* на структурных генах. В присутствии эффектора (индуктора) репрессор инактивируется и ген-оператор дает «сигнал» структурным генам начать работу. Б. Репрессор становится активным при соединении с эффектором: в данном случае роль эффектора может выполнять продукт одного из ферментов, образованных структурными генами (угнетение по принципу обратной связи).

Если оператор открыт, то каждый цистрон оперона синтезирует *м-РНК*, которая в свою очередь контролирует образование полипептидов в соответствии с генетической информацией, заключенной в оперонах.

Если же оператор закрыт, то никакого синтеза *м-РНК* не происходит. Оператор бывает закрыт, когда он вступает в контакт со специфическим цитоплазматическим *репрессором*, образованным *геном-регулятором*. Репрессор действует негативно в том

смысле, что в активном состоянии он останавливает синтез *m*-РНК и последующий синтез ферментов [107, 108].

Активность репрессора управляется специфическими метаболитами, получившими название *эффекторов*. При образовании индуцируемых ферментов индуктор действует как эффектор и инактивирует репрессор; это приводит к тому, что репрессия гена-оператора снимается. В результате цистроны в опероне могут начать синтез соответствующей *m*-РНК, а это в свою очередь приводит к синтезу закодированных в этих цитронах полипептидов, синтез которых в отсутствие индуктора был репрессирован. Было экспериментально показано, что в присутствии специфически индуцирующих эффекторов у делящихся бактерий резко возрастает количество образующейся *m*-РНК, способной образовывать гибриды с той фракцией ДНК, которая содержит соответствующий оперон [109]. Таким образом, действие репрессора, по-видимому, связано скорее с ингибированием образования *m*-РНК, чем с подавлением ее деятельности. Однако не исключена и последняя возможность; высказывалось предположение, что активность репрессоров может быть направлена против определенных форм *s*-РНК, необходимых для трансляции одного или нескольких цистронов данного оперона [105].

Другой тип репрессоров, так называемые *апорепрессоры* [203], связаны с регуляцией репрессируемых ферментов; эти репрессоры, активируясь в присутствии своего эффектора, закрывают соответствующий оператор (фиг. 12, В). Такая система уже упоминалась нами в гл. X в связи с механизмом обратной связи.

В свое время считали, что репрессоры являются полипептидами. Сейчас кажется более вероятным, что репрессоры представляют собой или РНК [130, 135], или, что еще вероятнее, белки, имеющие по 2 аллостерических участка [104]. Один из этих участков имеет сродство к последовательности нуклеотидов соответствующего гена-оператора. Второй имеет сродство к эффектору; при соединении эффектора с репрессором сродство репрессора к оператору видоизменяется.

Вполне вероятно, что каждый структурный ген в опероне может образовать свою собственную *m*-РНК (теория «один ген — одна *m*-РНК»). Но возможно также, что одна полицистронная молекула *m*-РНК синтезируется на всем опероне (теория «один оперон — одна *m*-РНК»). Сейчас накопилось уже много доводов в пользу второго предположения [109—111].

Наиболее удовлетворительным указанием на существование такой полицистронной *m*-РНК можно считать опыты с гистидиновым опероном у *Salmonella typhimurium*. Путь синтеза гистидина сейчас хорошо изучен; известно, что в нем принимают участие десять ферментов; их структурные гены расположены группой

в хромосоме *Salmonella*. Тонкая структура этих генов была подробно изучена и нанесена на карту [112]. Было подсчитано, что если отдельная молекула *m*-РНК соответствует целому гистидиновому оперону, то ее константа седиментации должна составлять приблизительно 38 S. Если же каждому отдельному ферменту соответствует своя *m*-РНК, то молекулярные веса таких *m*-РНК будут ниже. Экспериментальные данные показали, что коэффициент седиментации *m*-РНК для этой системы составляет 34 S. Полученная величина слишком велика для *m*-РНК, кодирующей какой-либо один из известных ферментов, и хорошо согласуется с величиной, предсказанной для *m*-РНК, соответствующей целому оперону [113]. Отсюда следует, что *m*-РНК может образовать с рибосомами комплекс, который способен синтезировать все полипептиды, закодированные в одном опероне.

В присутствии гистидина синтез ферментов гистидинового оперона подавляется [112]. Следовательно, мы имеем дело с системой, в которой репрессор взаимодействует с оператором только при наличии эффектора, в данном случае — гистидина (фиг. 101, Б).

Кроме гистидинового оперона, тщательному изучению подвергся лактозный оперон *E. coli* [114]. Если к растущей культуре *E. coli* добавить лактозу или некоторые другие галактозиды, то наблюдается координированный синтез трех ферментов:

1. β -Галактозидаза, которая гидролизует лактозу.
2. Тиогалактозидтрансацилаза, катализирующая перенос ацетильной группы с ацетилкофермента А на тиогалактозидный акцептор.
3. Галактозидпермеаза, регулирующая поступление лактозы в клетку.

Ферменты эти образуются в совершенно различных количествах. На долю α -галактозидазы приходится 6% белка в полностью индуцированной клетке *E. coli*, тогда как содержание трансацилазы достигает лишь 0,2%. Можно думать, что β -галактозидазный ген локализован ближе к оператору, чем трансацилазный ген [112, 114].

Следует подчеркнуть, что, хотя концепция оперона была выдвинута на основании данных, полученных при изучении небольшого числа бактериальных систем, применить ее, по-видимому, можно и в отношении более сложных систем, существующих в животных и растительных клетках [202, 203]. Следует, однако, указать, что в таких клетках в процессах регуляции белкового синтеза участвуют и гистоны (стр. 138).

У многоклеточных животных ядерная ДНК связана с гистонами [119, 120, 128], роль которых в течение многих лет оставалась загадкой. Еще в 1950 г. Седмен и Седмен [121] высказали предположение, что гистоны, возможно, регулируют генетиче-

скую актив
была поддер
из с гка
занный с
активность
Вместе с
какой-то у
на, то он
Такой хро
поддержив
РНК-поли
систему Р
E. coli), т
лина, хар
из точек
глобулина
из хромат
божденная
таты под
содержит
этого вида
закрывают
только бе
что этот м
дышах. И
большой
предотвращ
между ст
дит к син
белков, у
ДНК-зат
и ядрах

Мирс
выделен
ким соде
кислот в
концент
энергии,
в проце
ДНК-аз
тезу АТ
ДНК и

скую активность. Однако эта точка зрения в свое время не встретила поддержки. Только в 1962 г. Боннер и его сотрудники, работая с тканями растения, показали, что ДНК, полностью связанная с гистонами в комплекс, утрачивает свою матричную активность для ДНК-зависимого биосинтеза РНК [112, 123]. Вместе с тем, как показали опыты с хроматином гороха, если какой-то участок ДНК в хроматите остается свободным от гистона, то он бывает способен принимать участие в биосинтезе РНК. Такой хроматин после выделения из семян гороха поддерживал ДНК-зависимый биосинтез РНК в присутствии РНК-полимеразы из *E. coli*. Если к такой системе добавить систему РНК-зависимого синтеза белка на рибосомах (тоже из *E. coli*), то можно *in vitro* наблюдать синтез запасного глобулина, характерного для семян гороха [124, 125]. Хроматин из точек роста стебля, не синтезирующий *in vivo* запасного глобулина семян, не синтезирует его и *in vitro*. Однако если из хроматина точек роста стебля удалить гистоны, то высвобожденная ДНК поддерживает синтез глобулина. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что ДНК каждого вида содержит необходимую информацию для синтеза всех белков этого вида. Однако во многих тканях определенные участки ДНК закрыты гистонами, в результате чего в этих тканях образуются только белки, характерные для данной ткани. Вполне возможно, что этот механизм участвует в процессах дифференцировки в зародышах. В развивающихся яйцах лягушки структурные гены большей частью до гаструляции блокированы гистонами, что предотвращает синтез *m*-РНК [126]. После гаструляции связь между структурными генами и гистонами изменяется, что приводит к синтезу *m*-РНК, а это в свою очередь приводит к синтезу белков, характерных для каждой ткани или органа. Репрессия ДНК-затравок гистонами обнаружена также в печени [194] и ядрах зубной железы телят [126—129].

Синтез белка в ядре

Мирский, Олфри и Осава [137, 138, 139] показали, что в ядрах, выделенных из клеток зубной железы в растворе сахарозы с низким содержанием кальция, происходит включение меченых аминокислот в белки. Процесс этот зависит от наличия определенной концентрации ионов натрия и от присутствия такого источника энергии, как АТФ, который, возможно, синтезируется в ядре в процессе аэробного фосфорилирования. Ядра, обработанные ДНК-азой, т. е. лишенные ДНК, теряют способность как к синтезу АТФ, так и к поглощению аминокислот. При добавлении ДНК или других полианионных молекул оба процесса восстанавливаются.

ливаются. Подобно цитоплазме, ядро содержит ферменты, активирующие аминокислоты; активированные аминокислоты связываются с какой-то ядерной РНК, которая, по-видимому, играет такую же роль, как *s*-РНК цитоплазмы.

Обмен веществ в печени в связи с синтезом белка

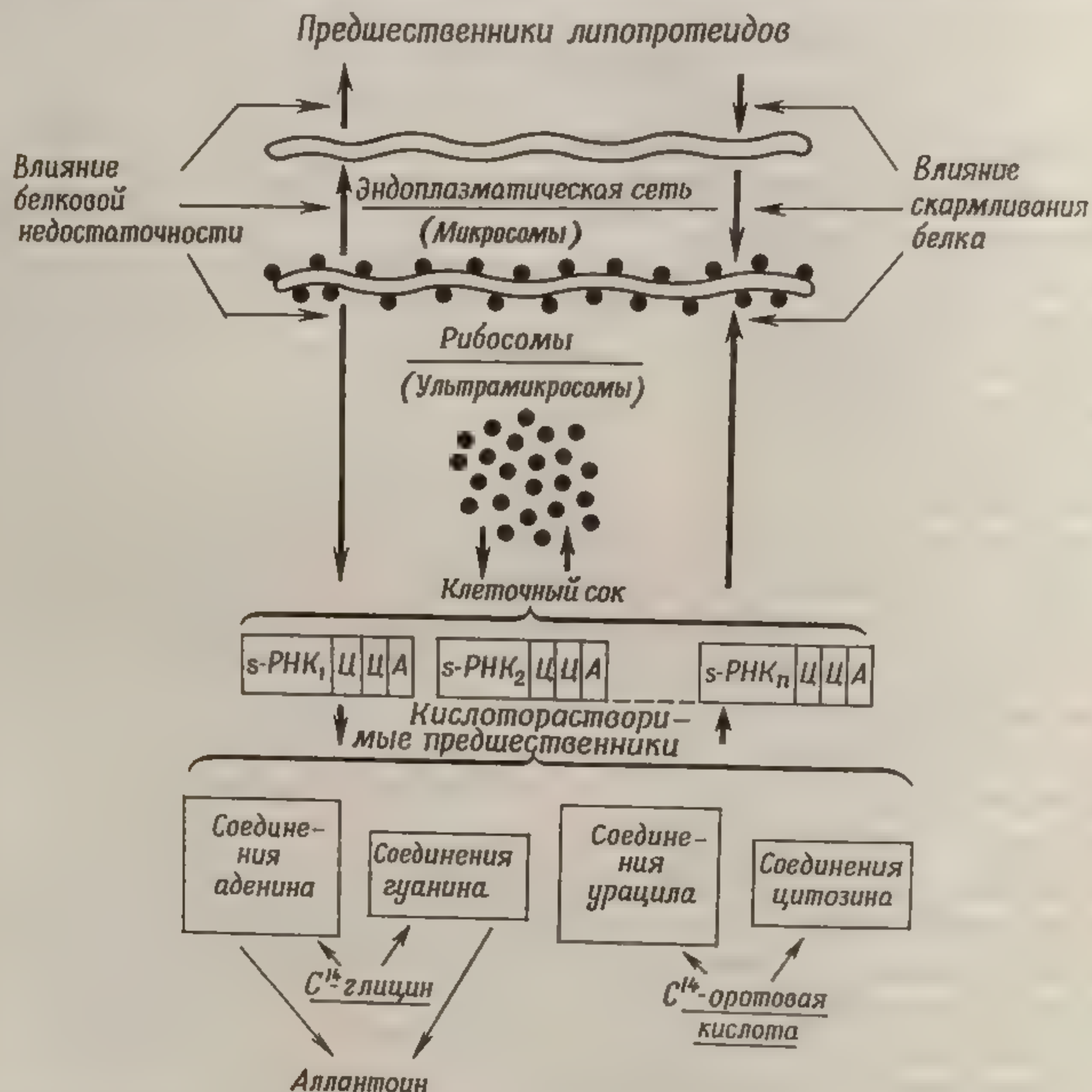
Исследования Замечника и многих других (см. выше) позволили нарисовать весьма правдоподобную картину той роли, которую РНК играет в биосинтезе белков. Однако зависимость белкового синтеза от скорости синтеза и распада РНК пока еще трудно понять. Так, например, наряду с системами, в которых между скоростью синтеза РНК и интенсивностью белкового синтеза существует, по-видимому, зависимость, известны и такие системы, в которых скорости синтеза белка и РНК как будто не связаны между собой. Печень представляет собой очень своеобразный пример системы, в которой при изменении аминокислотного состава пищи наступают довольно сложные сдвиги в метаболизме РНК. Мы уже упоминали (стр. 111) о том, что при скормливаниях крысам пищи с недостаточным содержанием белка их печень быстро теряет белки, РНК и фосфолипиды. Следовательно, состав диеты оказывает регулирующее воздействие на метаболизм каждого из перечисленных соединений. В случае РНК оно было подробно изучено в серии опытов, проведенных Манро и его сотрудниками. В первых своих опытах они установили [140], что поглощение P^{32} рибонуклеиновой кислотой, по-видимому, зависит от энергетического фонда пищи. Резкие же колебания в количестве съеденного белка не оказывали влияния на включение P^{32} ; данные эти согласовывались с более ранними наблюдениями других авторов [141]. Казалось бы, эти факты указывают на отсутствие связи между содержанием белка в пище и скоростью синтеза РНК. На первый взгляд это трудно увязывается с теми значительными изменениями количества РНК в печени, которые наступают при сдвигах в белковой диете. Поэтому было необходимо выяснить, каким образом поглощение белка может влиять на количество РНК, не изменяя при этом скорости синтеза. Для этого были поставлены новые опыты, в которых изменения в обмене РНК и белка были прослежены с помощью P^{32} и 2- C^{14} -глицина [142]. Оказалось, что РНК поглощает изотопы независимо от содержания белка в диете только в том случае, если животных кормят на протяжении всего опыта. Если же крыс после обильной белковой пищи заставляют голодать, то включение P^{32} в РНК падает очень заметно; еще сильнее снижается включение глицина в РНК. Исходя из различных данных, можно думать, что это явление

обусловлено разведением фонда предшественников продуктами распада РНК. В пользу такого предположения свидетельствует следующее наблюдение: у голодающих крыс глицин очень слабо включается в соединения аденина и гуанина, входящие в кислоторастворимую фракцию печени, т. е. во фракцию, из которой синтезируется РНК. Если таким голодающим животным скормить белок, то следы разведения фонда быстро сглаживаются: поступление P^{32} и глицина в РНК немедленно увеличивается. Особенно сильно возрастает углеродная метка в аденине и гуанине, входящих в кислоторастворимые фонды предшественников. Кроме того, у накормленных белком животных уменьшается образование аллантина. Таким образом, между доступностью аминокислот для белкового синтеза и стабильностью РНК печени имеется тесная взаимосвязь, в результате которой белковый уровень пищи определяет количество РНК в клетках печени, регулируя скорость ее распада.

С помощью дифференциального центрифугирования было изучено распределение РНК в различных фракциях печени. Оказалось, что у крыс, не получающих белок, основная потеря РНК приходится на микросомную фракцию, соответствующую эндоплазматической сети целой клетки [143]. Данные, полученные при помощи электронного микроскопа, также говорят о том, что в печеночных клетках голодающих крыс степень выраженности эндоплазматической сети резко ослабевает [144, 145]. Через несколько часов после скармливания животным белковой пищи начинается новообразование компонентов эндоплазматической сети: первыми появляются мембраны, пока еще лишенные рибосом; рибосомы возникают на вновь образованных мембранах позднее. Таким образом, изменения в обмене РНК, наблюдаемые при различном содержании в пище белка, по-видимому, тесно связаны с тем обстоятельством, что при изменении в пище содержания белка изменяется степень выраженности эндоплазматической сети.

Схематическое изображение тех процессов, которые, по мнению Манро и Кларка [146], происходят в печени при введении белка в пищу и при исключении его из рациона, показаны на фиг. 102. Поступление белка в организм приводит к образованию РНК эндоплазматической сети и накоплению на ее элементах РНК. По-видимому, эта РНК синтезируется не на сети, а в каких-то других участках клетки, откуда, уже будучи синтезированной, переносится на эндоплазматическую сеть; в частности, источником РНК эндоплазматической сети может служить РНК клеточного сока (s-РНК) [147]. Когда белок (или незаменимые аминокислоты) выключают из рациона, элементов эндоплазматической сети становится меньше, а распад РНК временно усиливается.

В результате происходит разведение фонда предшественников РНК за счет продуктов ее распада и усиливается выделение аллантина. Таким образом, первичные изменения при белковом голодании связаны, по-видимому, с формированием эндоплазматической сети. В связи с этим интересно, что при злокачественном росте



Фиг. 102. Влияние пищевого рациона на метаболизм РНК [147].

клеток печени эндоплазматическая сеть весьма скудна и в этих клетках не происходит сдвигов в метаболизме РНК в ответ на изменение белкового рациона [148].

РНК и центральная нервная система

С большим интересом было встречено предположение о существовании особого молекулярного механизма, накапливающего информацию в течение жизни индивидуума, т. е. что память о тех или иных событиях может сохраняться в нервной системе благодаря образованию или видоизменению особых молекул или

их комплексов, которые можно рассматривать как «молекулярный отпечаток или следы памяти» [168]. Больше всех для этой роли подходит РНК [162].

В настоящее время накоплено уже много фактов, указывающих на то, что метаболизм РНК тесно связан с хранением информации (память) и с научением [169, 170, 204]. Мы уже упоминали (стр. 112), что в процессе функционирования первых клеток содержание РНК в них может изменяться [158, 159]. Например, значительно изменяется соотношение оснований в ядерной РНК ядра Дейтерса крысы при научении ее балансировать [160]. Резко возрастает отношение аденин/урацил; этот сдвиг сохраняется в течение 48 час после окончания «уроков». Изменения в составе оснований были обнаружены и в прилежащих клетках нейроглии [161].

Менее надежные доказательства были получены в опытах с регенерирующими хвостами планарий; в этих опытах было показано, что РНК-аза препятствует сохранению условнорефлекторного ответа [179]. Трудно в действительности представить себе [205], как может осуществляться передача опыта или способности к научению от одной планарии к другой, когда одна планария, пожирая другую, съедает в результате ее РНК [180].

Еще одна серия доказательств основана на применении пуринового аналога, 8-азагуанина, который включается в нефункциональную РНК. Крысы с такой РНК не могут научиться тому, как выбраться из нового лабиринта. Вместе с тем 8-азагуанин не мешает воскрешать в памяти ранее изученный путь пересечения лабиринта [181].

Кроме того, в опытах со спинным мозгом крысы было установлено, что 8-азагуанин удлиняет период времени, необходимый для «закрепления опыта» [170, 171]. Этот период укорачивается при введении 1,1,3-трициано-2-амино-1-пропена, который, по имеющимся сведениям, увеличивает концентрацию РНК в нейронах [171].

Известны даже попытки использовать введение РНК для улучшения памяти у дряхлых людей [163].

Другие биологические воздействия

РНК обуславливает целый ряд разнообразных и, по-видимому, не связанных между собой биологических эффектов. Мы уже затрагивали этот вопрос в связи с инфекционной РНК вирусов (стр. 155).

РНК из различных источников (или выделенная из них фракция, устойчивая к РНК-азе) стимулирует образование гемолитических стрептококками так называемого стрептолизина S [164—166]. Этим свойством обладает также поли-(А, Г, У, Ц) [166].

РНК, выделенная из матки крысы, получавшей эстроген, оказывает действие на матку [200]. РНК из культур макрофагов, инкубированных с антигенами, способствует образованию специфических антител, если ее добавить к культуре лимфоцитов [201].

Роль РНК в индукции эмбриогенеза пока неясна. Имеющиеся данные обсуждаются в нескольких обзорах и критических статьях [149—157, 199].

ЛИТЕРАТУРА

1. Brachet J., Les Nucleoproteins, Onzième Conseil de Chimie, Institut de Chimie Solvay, pp. 1—24, Bruxelles, S. Stoops (1959).
2. Wiseman A., Organization for Protein Synthesis, Oxford, Blackwell, 1965.
3. Zamecnik P. C., Biochem. J., 85, 257 (1962).
4. Ingram V. M., The Biosynthesis of Macromolecules, New York, Benjamin (1965).
5. Zuckerkandl E., Pauling L., Evolving Genes and Proteins, p. 168 (Ed. J. Vogel), New York, Academic Press (1965).
6. Roberts R. B. (Ed.), Microsomal Particles and Protein Synthesis, London, Pergamon Press (1958).
7. Crick F. H. C., Symposia Soc. Exp. Biol., 12, 138, Cambridge University Press (1958).
8. Hoagland M. B., The Nucleic Acids, Vol. 3, p. 349 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1960). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1962, стр. 292.)
9. Gros S., The Nucleic Acids, Vol. 3, p. 409 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1960). (Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1962, стр. 338.)
10. Nathans D., Allende J. E., Conway T. W., Spyrides G. J., Lipmann F., Informational Macromolecules, p. 349 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 271.)
11. Roberts R. B., Informational Macromolecules, p. 367 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 284.)
12. Dintzis H. M., Knopf P. M., Informational Macromolecules, p. 375 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 291.)
13. Herbert E., Canellakis E. S., Methods in Enzymology, Vol. 6, p. 28 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1963).
14. Watson J. D., Science, 140, 17 (1963).
15. Fruton J. S., The Proteins, Vol. 1, p. 190 (Hans Neurath, Ed.), New York, Academic Press (1963).
16. Korner A., Mammalian Protein Metabolism, Vol. 1, p. 178 (H. N. Munro and J. B. Allison, Eds.) (1964).
17. Zamecnik P. C., The Molecular Control of Cellular Activity, p. 259 (J. M. Allen, Ed.) (1962).
18. Chantrenne H., The Biosynthesis of Proteins, London, Pergamon Press (1961).
19. Racker I. D., Metabolic Pathways, Vol. 2, p. 263 (D. M. Greenberg, Ed.) (1961).

20. Caspersson T., *Naturwiss.*, **29**, 33 (1942); *Cell Growth and Cell Function*, New York, Norton and Co (1950).
21. Brachet J., *Chemical Embryology*, New York, Interscience Publishers, Inc, 1950.
22. Gale E. F., *Recent Progress in Microbiol.* (G. Tunevall, Ed.), 7th Internat. Cong. Microbiol., Stockholm, 1958, p. 104 (1959).
23. Gale E. F., *Biochem. Soc. Symp.*, No. 14, p. 47 (1957); *The Harvey Lectures*, Series 51, p. 25 (1955—1956).
24. Gale E. F., *Enzymes: Units of Biological Structure and Function*, p. 49 (O. H. Gaebler, Ed.), New York, Academic Press (1956).
25. Gale E. F., *Sci. Amer.*, **195**, 42 (1956).
26. Gale E. F., *Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism*, p. 175, London, Churchill (1956).
27. Gale E. F., Folkes J. P., *Nature*, **592** (1955).
28. Spiegelman S., *Enzymes: Units of Biological Structure and Function* p. 67 (O. H. Gaebler, Ed.), New York, Academic Press (1956).
29. Spiegelman S., *Recent Progress in Microbiol.* (G. Tunevall, Ed.), 7th Internat. Cong. Microbiol., Stockholm, 1958, p. 81 (1959).
30. Spiegelman S., *Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism*, p. 185, London, Churchill (1956).
31. Spiegelman S., *The Chemical Basis of Heredity*, p. 232 (W. H. Elroy and B. Glass, Eds.), Baltimore, Johns Hopkins Press (1957).
(Химические основы наследственности, М., ИЛ, 1960, стр. 209.)
32. Allfrey V. G., Daly M. M., Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.*, **37**, 157 (1953).
33. Borsook H., Deasy C. L., Haagen-Smit A. J., Keighley G., Lowy P. H., *J. Biol. Chem.*, **196**, 669 (1952).
34. Siekevitz P., *J. Biol. Chem.*, **195**, 549 (1952).
35. Borsook H., Deasy C. L., Haagen-Smit A. J., Keighley G., Lowy P. H., *J. Biol. Chem.*, **184**, 529 (1950).
36. Hultin T., *Exp. Cell Res.*, **1**, 376 (1950).
37. Keller E. B., Zamecnik P. C., Loftfield R. B., *J. Histochem. Cytochem.*, **2**, 378 (1954).
38. Littlefield J. W., Keller E. B., Gross J., Zamecnik P. C., *J. Biol. Chem.*, **217**, 111 (1955).
39. Zamecnik P. C., Keller E. B., Littlefield J. W., Hoagland M. B., Loftfield R. B., *J. Cell Comp. Physiol.*, **47**, Suppl. 1, 81 (1956).
40. Hoagland M. B., Keller E. B., Zamecnik P. C., *J. Biol. Chem.*, **218**, 345 (1956).
41. Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **44**, 67 (1958).
42. Hoagland M. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 288 (1955).
43. Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Hecht L. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **44**, 73 (1958).
44. Hoagland M. B., Stephenson M. L., Scott J. F., Hecht L. I., Zamecnik P. C., *J. Biol. Chem.*, **231**, 211 (1958).
45. Acs G., Hartmann G., Bowman H. G., Lipmann F., *Fed. Proc.*, **18** (1), 178 (1959).
46. Smith K. C., Cordes E., Schweet R. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 286 (1959).
47. Chapeville F., Lipmann F., von Ehrenstein G., Weisblum B., Ray W. J., Jr., Benzer S., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**, 1086 (1962).
48. Nathans D., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **47**, 497 (1961).
49. Fessenden J. M., Moldave K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **6**, 232 (1961).

50. Noll H., Staehelin T., Wettstein F. O., *Nature*, 198, 632 (1963).
51. Morris A. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 11, 201 (1963).
52. Nathans D., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 51, 585 (1964).
53. Crick F. H. C., *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 1, p. 163 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Нуклеиновая кислота, М., «Мир», 1965, стр. 185.)
54. Crick F. H. C., *Science*, 139, 461 (1963).
55. Crick F. H. C., *Sci. Amer.*, Oct., p. 3 (1962).
56. Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J., *Nature*, 192, 1227 (1961).
57. Nirenberg M. W., *Sci. Amer.*, March, p. 2 (1963).
58. Nirenberg M. W., Matthaei J. H., Jones O. W., Martin R. G., Barondes S. H., *Fed. Proc.*, 22, 55 (1963).
59. Nirenberg M. W., Jones O. W., Jr., *Informational Macromolecules*, p. 451 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 347.)
60. Jukes T. H., *Advances in Biological and Medical Physics*, Vol. 9, p. 1 (J. H. Lawrence and J. W. Gofman, Eds.) (1963).
61. Ochoa S., *Experientia*, 20, 57 (1964).
62. Nirenberg M. W., Jones O. W., Leder P., Clark B. F. C., Sly W. S., Pestka S., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 549 (1963). (Биосинтез белка и его регуляция, М., «Мир», 1967, стр. 105.)
63. Speyer J. S., Lengyel P., Basilio C., Wahba A. J., Gardner R. S., Ochoa S., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 559 (1963).
64. Staehelin T., Wettstein F. O., Oura H., Noll H., *Nature*, 201, 264 (1964).
65. Doctor D. P., Apgar J., Holley R. W., *J. Biol. Chem.*, 236, 1171 (1961).
66. Sueoka N., Yamane T., *Informational Macromolecules*, p. 205 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 162.)
67. Weisblum B., Benzer S., Holley R. W., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48, 1449 (1962).
68. Bennett T. P., Goldstein J., Lipmann F., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 233 (1963). (Биосинтез белка и его регуляция, М., «Мир», 1967, стр. 131.)
69. Von Ehrenstein G., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47, 941 (1961).
70. Maxwell E. S., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48, 1639 (1962).
71. Wittmann H. G., *Z. Vererbungslehre*, 93, 491 (1962).
72. Wittmann H. G., Wittman-Liebold B., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 589 (1963).
73. Nisman B., Pelmont J., *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 3, p. 236 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, Eds.), New York, Academic Press (1964).
74. Tsugita A., Fraenkel-Conrat H., Nirenberg M. W., Matthaei J. H., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48, 846 (1962).
75. Arnstein H. R. V., Cox R. A., *Biochem. J.*, 93, 33c (1964).
76. Schwartz J. H., Eisenstadt J. M., Brawerman G., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 53, 195 (1965).

77. Yanofsky C., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 581 (1963). (Бiosинтез белка и его регуляция, М., «Мир», 1967, стр. 141.)
78. Yanofsky C., Informational Macromolecules, p. 195 (H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen, Eds.), New York, Academic Press, (1963). (Информационные макромолекулы, М., «Мир», 1965, стр. 389.)
79. Williamson A. R., Sweet R., Nature, 202, 435 (1964).
80. Sweet R., Bishop J., Molecular Genetics, Part I, p. 353 (J. H. Taylor, Ed.), New York, Academic Press (1963). (Молекулярная генетика, М., «Мир», 1964, стр. 385.)
81. Bretscher M. S. J. Mol. Biol., 7, 446 (1963).
82. Gilbert W., J. Mol. Biol., 6, 374 (1963).
83. Gilbert W., J. Mol. Biol., 6, 389 (1963).
84. Gilbert W., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 287 (1963). (Бiosинтез белка и его регуляция, М., «Мир», 1967, стр. 9.)
85. Risebrough R. W., Tissieres A., Watson J. D., Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 430 (1962).
86. Warner J. R., Rich A., Hall C. E., Science, 138, 1399 (1962).
87. Warner J. R., Knopf P. M., Rich A., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 122 (1963).
88. Goodman H. M., Rich A., Nature, 199, 318 (1963).
89. Rich A., Warner J. R., Goodman H. M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 269 (1963). (Бiosинтез белка, и его регуляция, М., «Мир», 1967, стр. 160.)
90. Wettstein F. O., Staehelin T., Noll H., Nature, 197, 430 (1963).
91. Staehelin T., Wettstein F. O., Noll H., Science, 140, 180 (1963).
92. Staehelin T., Brinton C. C., Wettstein F. O., Noll H., Nature, 199, 865 (1963).
93. Gierer A., J. Mol. Biol., 6, 148 (1963).
94. Marks P. A., Burka E. R., Rifkind R., Danon D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 1 (1963).
95. Hardesty B., Miller R., Sweet R., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 924 (1963).
96. Slayter H. S., Warner J. R., Rich A., Hall C. E., J. Mol. Biol., 7, 652 (1963).
97. Schaechter M., J. Mol. Biol., 7, 561 (1963).
98. Kiho Y., Rich A., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 111 (1964).
99. Guttman B., Novick A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 373 (1963).
100. Levinthal C., Fan D. P., Higa A., Zimmerman R. A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 183 (1963).
101. Ingram V. M., The haemoglobins in genetics and evolution, Columbia University Press, 1963.
102. Monod J., Jacob F., Gros F., Biochem. Soc. Symp., No. 21, p. 104 (1961).
103. Monod J., Chargeux J.-P., Jacob F., J. Mol. Biol., 6, 306 (1963).
104. Jacob F., Monod J., Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis, p. 30 (M. Locke, Ed.), 1963.
105. Stent G. S., Science, 144, A1210 (1964).
106. Ames B. N., Martin R. G., Ann. Rev. Biochem., 33, 235 (1964).
107. Novick A., Lennox S., Jacob F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 397 (1963).
108. Gallant J., Stapleton R., J. Mol. Biol., 8, 431 (1964).

109. Attardi G., Naono S., Rouviere J., Jacob F., Gros F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 363 (1963).
(Биосинтез белка и его регуляция, М., «Мир», 1967, стр. 239.)
110. Ohtaka Y., Spiegelman S., Science, 142, 493 (1963).
111. Spiegelman S., Hayashi M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 161 (1963). Синтез и структура нуклеиновых кислот. М., «Мир», 1967, стр. 189.)
112. Ames B. N., Hartman P. E., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 349 (1963). (Биосинтез белка и его регуляция, М., «Мир», 1967, стр. 259.)
113. Martin R. G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 357 (1963). (Синтез и структура нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1966, стр. 369.)
114. Zabin I., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 431 (1963).
115. Takanami M., Zubay G., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 834 (1964).
116. Davies J., Gilbert W., Gorini L., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 883 (1964).
117. Ingram V. M., Haemoglobin and its Abnormalities, Springfield, Thomas, 1960.
118. Nirenberg M. W., Methods in Enzymology, Vol. 6, p. 17 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), New York, Academic Press (1963).
119. Busch H., Steele W. J., Hnilica L. S., Taylor C. W., Mavioglu H., J. Cell and Comp. Physiol., Suppl. to 62, 95 (1963).
120. Bloch D. P., J. Cell and Comp. Physiol., Suppl. to 62, 87 (1963).
121. Stedman E., Stedman E., Nature, 166, 780 (1950).
122. Huang R. C., Bonner J., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1216 (1962).
123. Bonner J., Huang R. C., J. Mol. Biol., 6, 169 (1963).
124. Bonner J., Huang R. C., Gilden R. V., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 893 (1963).
125. Huang R. C., Bonner J., Murray K., J. Mol. Biol., 8, 54 (1964).
126. Moore B. C., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 1018 (1963).
127. Allfrey V. G., Littan V. C., Mirsky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 414 (1963).
128. Frenster J. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 1026 (1963).
129. Hindley J., Biochem. Biophys. Res. Comm., 12, 175 (1963).
130. Bowne S. W., Rogers P., Biochim. Biophys. Acta, 76, 600 (1963).
131. Cannon M., Krug R., Gilbert W., J. Mol. Biol., 7, 360 (1963).
132. Ochoa S., Bull. N. Y. Acad. Sci., 40, 387 (1964).
133. Baer D., J. Theoret. Biol., 6, 282 (1964).
134. Allfrey V. G., Mirsky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1590 (1962).
135. Sypherd P. S., Strauss N., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 1059 (1963).
136. Reichman M. E., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 1009 (1964).
137. Allfrey V. G., Mirsky A. E., Osawa S., J. Gen. Physiol., 40, 451 (1957).
138. Mirsky A. E., Osawa S., Allfrey V. G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 21, 49 (1956).
139. Allfrey V. G., Mirsky A. E., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 247 (1963). (Биосинтез белка и его регуляция, М., «Мир», 1967, стр. 318.)
140. Munro H. N., Naismith D. J., Wikramanayake T. W., Biochem. J., 54, 198 (1953).

141. Campbell R. M., Kosterlitz H. W., J. Biol. Chem., 175, 989 (1948).
142. Clark C. M., Naismith D. J., Munro H. N., Biochim. Biophys. Acta, 23, 587 (1957).
143. Wikramanayake T. W., Heagy F. C., Munro H. N., Biochim. Biophys. Acta, 11, 566 (1953).
144. Fawcett D. W., J. Nat. Cancer Inst., 15, 1475 (1955).
145. Bernard W., Roniller C., J. Biophys. Biochem. Cytol., Suppl., 2, 75 (1956).
146. Munro H. N., Clark C. M., Proc. Nutrit. Soc., 19, 55 (1960).
147. Munro H. N., Clark C. M., Biochim. Biophys. Acta, 33, 551 (1959).
148. Munro H. N., Clark C. M., Brit. J. Cancer, 13, 324 (1959).
149. Niu M. C., Cellular Mechanisms in Differentiation and Growth, p. 155 (D. Rudnick, Ed.), Princeton, University Press (1956).
150. Brachet J., Acidi nucleici e loro funzione biologica, p. 289, Milan, Istituto Lombardo (1964).
151. Brachet J., Kuusi T., Gothie S., Arch. Biol., 64, 429 (1952).
152. Brachet J., J. Cell Comp. Physiol., 60 (Suppl. 1), 1 (1963).
153. Niu M. C., Developmental Biology, 7, 379 (1963).
154. Hayashi Y., Takata K., Embryologia, 4, 149 (1958).
155. Hayashi Y., Embryologia, 4, 33 and 327 (1958).
156. Sachs L., Acidi nucleici e loro funzione biologica, p. 316, Milan, Istituto Lombardo (1964).
157. Hayashi Y., Develop. Biol., 1, 247 (1959).
158. Hydén H., Endeavour, 21, 144 (1962).
159. Hydén H., Pigon A., J. Neurochem., 6, 57 (1960).
160. Hydén H., Egyhazi E., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1366 (1962).
161. Hydén H., Egyhazi E., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 618 (1963).
162. Rose S. P. R., Discovery, 25, 38 (1964).
163. Cameron E., Sved S., Solyom L., Wainrib B., Barik H., Am. J. Psychiatry, 120, 320 (1963).
164. Okamoto H., Japan J. Med. Sci. (IV. Pharmacol.), 12, 167 (1939).
165. Bernheimer A. W., J. Exp. Med., 90, 373 (1949).
166. Tanaka K., Egami F., Hayashi T., Winter J. E., Bernheimer A. W., Mii S., Ortiz P. J., Ochoa S., Biochim. Biophys. Acta, 25, 663 (1957).
167. Watson J. D., Abstracts of Proceedings of Sixth International Congress of Biochemistry, New York, I-S, 15 (1964).
168. Dingman W., Sporn M. B., Science, 144, 26 (1964).
169. Gerard R. W., J. Verbal Learning and Verbal Behaviour, 2, 22 (1963).
170. Chamberlain T. J., Halick P., Gerard R. W., J. Neurophysiol., 26, 662 (1963).
171. Chamberlain T. J., Rothschild G. H., Gerard R. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 918 (1963).
172. Zuckerkandl E., J. Mol. Biol., 8, 128 (1964).
173. Nirenberg M. W., Matthaei J. H., Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 1580 and 1588 (1961).
174. Wood W. B., Berg P., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 94 (1962).
175. Leder P., Clark B. F. C., Sly W. S., Pestka S., Nirenberg M. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 1135 (1963).
176. Allen D. W., Zamecnik P. C., Biochem. Biophys. Res. Comm., 11, 294 (1963).
177. Bennett J. C., Dreyer W. J., Ann. Rev. Biochem., 33, 205 (1964).

178. Mathias A. P., Williamson R., Huxley H. E., Page S., J. Mol. Biol., 9, 154 (1964).
179. Corning W. C., John E. R., Science, 134, 1363 (1961).
180. McConnell J. Neuropsychiat., 3, Suppl. 1, 542 (1962).
181. Dingman W., Sporn M. B., J. Psychiat. Res., 1, 1 (1961).
182. Sekeris C. E., Lang N., Life Sciences, 3, 625 (1964).
183. Warner J. R., Rich A., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 1134 (1964).
184. Munro A., Jackson R., Korner A., Biochem. J., 92, 289 (1964).
185. Leder P., Nirenberg M., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 420 and 1521 (1964).
186. Rich A., Sci. Amer., 209 (6), 44 (1963).
187. Sekeris C., Karlson P., Arch. Biochem. Biophys., 105, 483 (1964).
188. Pauling L., Bull. N. Y. Acad. Med., 40, 334 (1964).
189. Tatum E. L., Bull. N. Y. Acad. Med., 40, 361 (1964).
190. Szer W., Ochoa S., J. Mol. Biol., 8, 823 (1964).
191. Ochoa M., Weinstein J. B., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 470 (1964).
192. Nirenberg M., Leder P., Science, 145, 1399 (1964).
193. Von Ehrenstein G., Dais D., Proc. Nat. Acad. Sci., 50, 81 (1963).
194. Lehnert S. M., Biochim. Biophys. Acta, 80, 338 (1964).
195. Fraenkel-Conrat H., Scientific American, 211, 47 (1964).
196. McLaughlin C. S., Ingram V. M., Science, 145, 942 (1964).
197. Wolfenden R., Rammler D. H., Lipmann F., Biochemistry, 3, 329 (1964).
198. Byrne R., Levin J. G., Bladen H. A., Nirenberg M. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 140 (1964).
199. Niu M. C., Acidi nucleici e loro funzione biologica, p. 352, Milan, Istituto Lombardo (1964).
200. Segal S. J., Davidson O. W., Wada K., Proc. 6th Internat. Cong. Biochem., New York, Abstract IX-83 (1964).
201. Fishman M., Adler F. L., J. exp. Med., 117, 595 (1963).
202. Jacob F., Monod J., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 193 (1961). (Регуляторные механизмы клетки, М., «Мир», 1964, стр. 278.)
203. Pitot H. C., Heidelberger C., Cancer Research, 23, 1694 (1963).
204. Hydén H., Egyhazi E., Proc. Nat. Acad. Sci., 53, 1030 (1964).
205. Bennett E. L., Calvin M., Neurosciences Research Progress Bulletin, 2 (4), 3 (1964).
206. Friedman S. M., Weinstein J. B., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 988 (1964).
207. Trupin J. S., Nirenberg M. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 53, 807 (1965).
208. Jukes T. H., J. Amer. Dietetic Assoc., 45, 517 (1964).
209. Bernfield M. R., Nirenberg M. W., Science, 147, 479 (1965).
210. Williamson A. R., Sweet R., Nature, 206, 29 (1965).

Несм
в 1865 г
телей, и
На их ф
во-перв
и живот
локализ
Однако
не обна
пневмор

Одно
заключ
moniae)
каждый
капсул
ствами
кокка,
способ
рос на
отличн
сулы.
в мыш
типа I
лентны
то вещ
бескар
сахар
В
пневм
транс
ки, а
ции,

ГЛАВА XIV

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ ДНК

Введение

Несмотря на то что нуклеиновые кислоты были открыты еще в 1865 г. и долгое время привлекали внимание многих исследователей, их роль в жизни клетки оставалась совершенно неясной. На их фундаментальное значение в процессах жизни указывало, во-первых, их присутствие в составе не только растительных и животных клеток, но и бактерий и вирусов и, во-вторых, их локализация в клетках, изученная гистохимическими методами. Однако сущность их роли оставалась загадкой до тех пор, пока не обнаружили, что вещество, ответственное за «трансформацию» пневмококков, является полинуклеотидом [1, 3, 10, 13, 14].

Трансформирующие факторы бактерий

Одно из наиболее выдающихся достижений иммунологии заключается в классификации пневмококков (*Diplococcus pneumoniae*) на ряд форм; существует несколько типов пневмококков, каждый из которых синтезирует специфический полисахарид — капсулы с характерными серологическими и химическими свойствами. В 1928 г. Гриффитс обнаружил, что один штамм пневмококка, культивируемый в особых условиях *in vitro*, утратил способность к синтезу соответствующего полисахарида и поэтому рос на твердой среде в виде так называемых складчатых колоний, отличных от гладких, блестящих колоний клеток, имеющих капсулы. Если живую культуру таких бескапсульных клеток ввести в мышь одновременно с убитыми капсульными пневмококками типа III, то в организме мыши можно обнаружить живые вирулентные пневмококки с капсулами типа III. По-видимому, какое-то вещество, имевшееся в мертвых бактериях типа III, наделило бескапсульные пневмококки способностью синтезировать полисахариды, характерные для типа III.

В последующие 5 лет было найдено, что такие трансформации пневмококков можно воспроизводить *in vitro*, что в качестве трансформирующего агента можно использовать не убитые клетки, а экстракт из них и что организмы, подвергшиеся трансформации, не возвращаются спонтанно к исходному типу.

Химическая природа трансформирующего фактора оставалась неизвестной. Только в 1944 г. Эвери, Мак-Леод и Мак-Картти (из Рокфеллеровского института в Нью-Йорке) обнаружили, что ДНК, экстрагированная из капсульных гладких штаммов пневмококков типа III, будучи добавлена в культуральную среду, превращает бескапсульные бугорчатые клетки в полностью инкапсулированные гладкие клетки типа III [2]. Полученные гладкие клетки могут размножаться далее сами по себе и давать потомство такого же гладкого типа с новой ДНК, обладающей теми же свойствами. Следовательно, ДНК пневмококков способна не только вызывать свою собственную редупликацию, но и индуцировать специфическое наследуемое свойство — синтез капсулы. Иными словами, она выполняет две функции, обычно приписываемые гену.

Очень важно установить, действительно ли одна только ДНК является тем химическим соединением, которое осуществляет трансформацию, и исключить возможность того, что какой-то другой фактор, например связанный с ДНК белок или углевод, может также принимать участие в процессах трансформации. Известно, что ДНК очищенного трансформирующего фактора не содержит ни химически улавливаемого, ни серологически обнаруживаемого белка. Кроме того, известно, что этот фактор не инактивируется протеолитическими ферментами, но зато инактивируется дезоксирибонуклеазой. Более того, при гидролизе трансформирующего фактора образуется всего лишь одна аминокислота — глицин, о которой известно, что она возникает при расщеплении аденина. Приведенные данные свидетельствуют, что ДНК является единственным трансформирующим фактором.

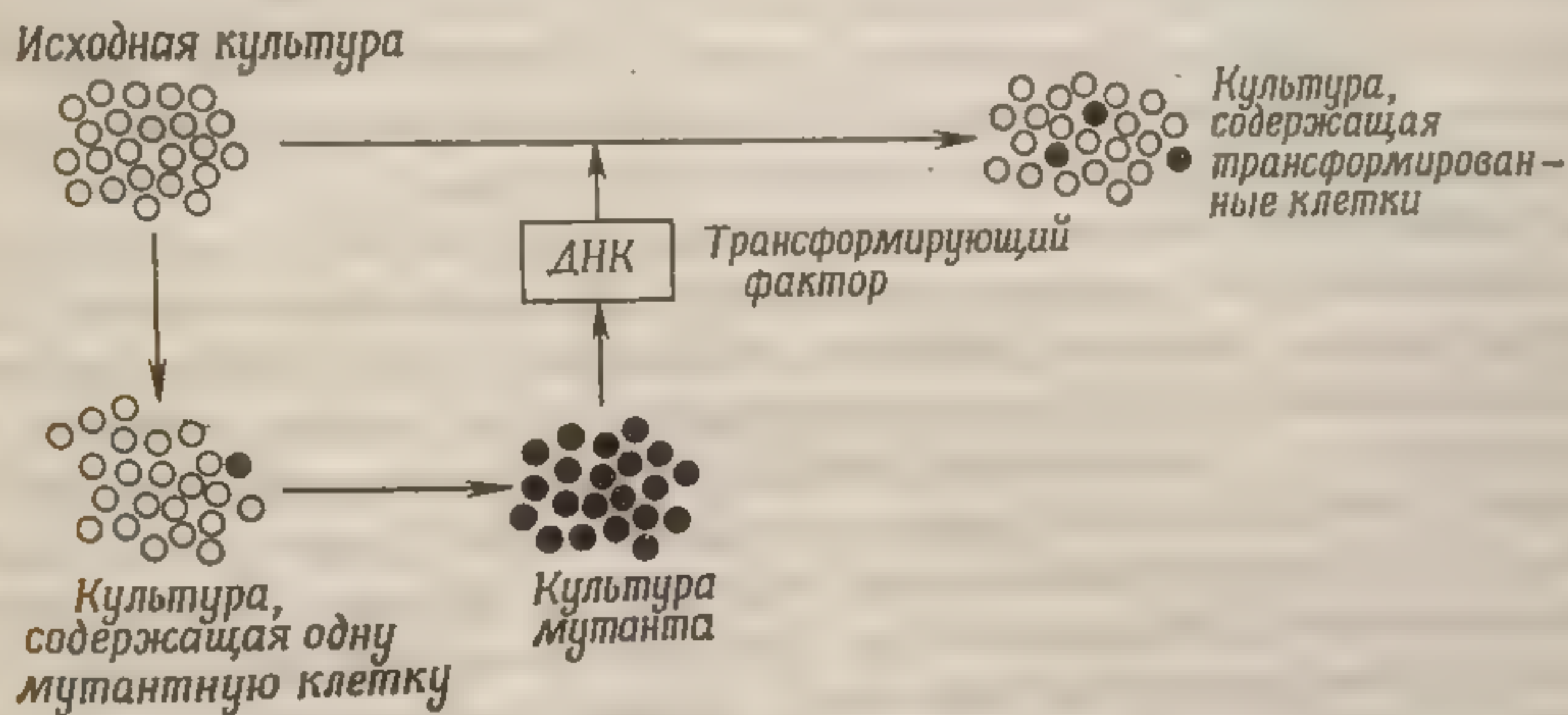
Описанные результаты вызвали большой интерес к явлению бактериальной трансформации. Дальнейшие поиски показали, что эффект не ограничивается пневмококками, но может быть получен на многих бактериях, например на *Haemophilus influenza* [3, 4], *Escherichia coli* [5] и на менингококке. Эти трансформации не ограничиваются изменениями серологического типа — они могут наделить бактерии устойчивостью к специфическим лекарствам или антибиотикам или же способностью использовать те или иные питательные вещества. К настоящему времени известно свыше 20 различных примеров трансформаций капсулярных признаков, в том числе трансформации 15 различных полисахаридных антигенов. Более 30 биохимически совершенно различных признаков было привнесено *in vitro* при помощи бактериальных ДНК в клетки гомологичных видов.

Ниже перечислены некоторые признаки, приобретенные бактериями в результате трансформации с помощью препаратов ДНК *in vitro*

Капсульные антигены	<i>D. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>N. meningitidis</i> <i>E. coli</i>
Устойчивость к пенициллину	<i>D. pneumoniae</i>
Устойчивость к стрептомицину	» »
Устойчивость к стрептомицину	<i>H. influenzae</i>
Устойчивость к сульфаниламиду	<i>D. pneumoniae</i>

Сущность «трансформирующего» действия

Среди проведенных в последнее время исследований одной из наиболее интересных была превосходная работа Хочкисса [6—12], посвященная устойчивости к лекарствам и антибиотикам.



Фиг. 103. Схема трансформации, осуществляемой ДНК.

Мы опишем подробнее методику его опытов по получению устойчивости, например, к стрептомицину (фиг. 103). Бульон, содержащий стрептомицин, засевают пневмококками. В течение инкубации клетки умирают. Однако отдельные случайные клетки, представляющие собой устойчивые к стрептомицину мутанты, выживают и размножаются. При пересадке на агар они образуют колонии и размножаются. При пересадке на агар они образуют колонии устойчивых к стрептомицину организмов. Их можно культивировать на бульоне и получить густую суспензию клеток. Суспензию эту обрабатывают дезоксихолатом натрия (чтобы разрушить клетки), затем, добавляя этанол, выделяют ДНК, которая выпадает в осадок в виде нитей, легко отделяемых для последующей очистки.

На бульоне вновь приготавливают культуру чувствительных к стрептомицину пневмококков. После 3-часовой инкубации при 37° культуру охлаждают в течение 20 мин при 25°, чтобы

приостановить деление на какой-то одной, одинаковой для всех клеток фазе цикла деления. Когда такую культуру нагревают вновь до 37° , все клетки начинают синхронно делиться. В этот период к культуре добавляют ДНК из устойчивого штамма и дают ей в течение 5 мин воздействовать на клетки. Затем обрабатывают культуру ДНК-азой, разрушающей всю внеклеточную ДНК, и продолжают инкубацию еще 2 час. Уже через 45 мин появляются признаки устойчивости к стрептомицину; такая клетка медленно делится, и в течение нескольких поколений новая ДНК передается только одной из ее дочерних клеток. Наконец, клетка начинает удваивать ДНК и передавать ее обеим дочерним клеткам, которые также удваивают ДНК при делении.

Часть культуры затем переносят на среду, содержащую стрептомицин; нетрансформированные клетки на ней погибают, а устойчивые выживают; в конце опыта их можно сосчитать. Таким путем можно количественно выявить только относительно небольшое число трансформированных клеток. Именно трудностью обнаружения, возможно, объясняются неудачи при попытках трансформировать не бактерии, а другие организмы.

Обычно доля трансформированных клеток из всех клеток, обработанных соответствующей ДНК, действительно мала. Хочется, однако, удалось добиться величины 17%. Один из факторов, способствующих успеху, заключается в выборе более восприимчивого к трансформирующему агенту штамма, поскольку штаммы могут сильно различаться. Второй фактор — концентрация ДНК и длительность обработки ею клеток. Оптимальная концентрация составляет около $0,5 \cdot 10^{-6}$ г/мл; оптимальным для трансформации временем является период непосредственно после завершения цикла деления. Если пневмококки охлаждать до температуры, при которой рост останавливается, а затем вновь подогреть, они начинают делиться синхронно и случаев трансформации становится исключительно много.

Пока еще не выяснено окончательно, каким образом трансформирующая ДНК проникает в клетку. Известно, что на приобретение новых признаков, индуцированных ДНК, нужно более 1 час и что после ассимиляции новой ДНК клетка некоторое время размножается медленнее, чем ее невидоизменившиеся соседи. Обладание механизмом для удвоения новой ДНК требует еще более длительного срока.

Оказалось, что с помощью одного и того же препарата ДНК можно вызвать трансформацию по нескольким наследуемым признакам, а именно один образец ДНК может индуцировать у восприимчивых бактерий три признака: устойчивость к пенициллину, устойчивость к стрептомицину и способность образовывать капсулу. Такой образец ДНК может осуществлять трансформа-

цию у
ток обл
ков, 2%
чаев б
Следова
передат
в некот
ленных
вости
как спо
энергии

Вер
в биоло
мацию
были
способ
ных из
проявл
в обыч
гетерог
курент
кокков
блокир
ДНК

По-
к тому
«чужды
ружил
фактор
что ш
приобр
ствии
рован
форм
Эта ф
мация
органи
рующ
(«адап
ного»)
перед
в «сп
инду
форми
менто

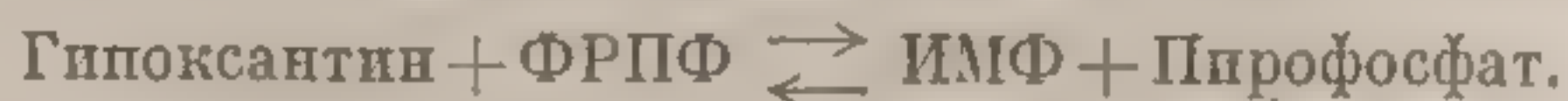
цию у 5% обработанных клеток. 98% трансформированных клеток обладают только одним из трех трансформированных признаков, 2% приобретают два новых признака и лишь в 0,01% случаев будет наблюдаться появление всех трех новых свойств. Следовательно, с помощью препаратов ДНК нельзя осуществить передачу полного набора признаков донора реципиенту, хотя в некоторых случаях все же возможна передача нескольких сцепленных между собой признаков. Например, признак устойчивости к стрептомицину сцеплен, очевидно, с таким признаком, как способность пневмококка использовать в качестве источника энергии маннит.

Вероятно, ДНК каждого организма или вида различаются в биологическом отношении. Все попытки осуществить трансформацию в пневмококках введением ДНК из других источников были безуспешными. Такие посторонние (гетерогенные) ДНК способны, однако, проникать в пневмококки; не вызывая заметных изменений в свойствах клетки, они могут воспрепятствовать проявлению трансформирующей активности той ДНК, которая в обычных условиях вызывает трансформацию. Другими словами, гетерогенные ДНК действуют в некоторых отношениях как конкурентные ингибиторы; будучи достаточно схожими с пневмококковой ДНК, они легко проникают в клетку, а проникнув, блокируют в ней трансформирующее действие вводимой затем ДНК из пневмококков.

По-видимому, любая трансформация по существу сводится к тому, что бактерия приобретает способность к синтезу ранее «чуждых» ей ферментов. Мармур и Хюкисс [20] первыми обнаружили, что в организме, обработанном трансформирующим фактором (ДНК), появляется новый фермент. Так, они показали, что штамм пневмококков, не способный к окислению маннита, приобретает эту способность, если его культивировать в присутствии ДНК из штаммов, окисляющих этот сахар. Трансформированные таким путем организмы отличаются от родительских форм наличием нового фермента — маннитфосфатдегидрогеназы. Эта ферментная система относится к индуцируемому, и трансформация делает клетку способной синтезировать фермент, когда организм попадает на среду, содержащую маннит. Трансформирующая ДНК может быть приготовлена или из индуцированного («адаптированного»), или из неиндуцированного («неадаптированного») пневмококка-донора; способность использовать маннит передается через ДНК как наследственное свойство, находящееся в «спячке» до тех пор, пока клетки не окажутся в присутствии индуктора (маннита). Отсюда можно сделать вывод, что трансформирующая ДНК обеспечивает способность к образованию ферментов, а не синтез сам по себе.

Чаргафф и его сотрудники [58] выделили ДНК из протопластов дикого штамма *E. coli* и этой ДНК обрабатывали мутант, нуждающийся в лизине. Оказалось, что в результате такой обработки у бактерий, ауксотрофных по лизину, восстанавливается прототропный тип питания, при котором протопласт уже не нуждается в поступлении лизина извне. Эта форма бактериальной трансформации была названа ими «восстановительной».

Данные о бактериальной трансформации обсуждаются в многочисленных обзорах [9—11, 15—17, 25, 26]. Можно ли получить аналогичные соматические трансформации у животных, пока еще точно не установлено. Известно лишь несколько опытов, указывающих на возможность трансформации у многоклеточных. Например, выделили ДНК из культуры клеток человека линии D98S, в которых содержится фермент ИМФ-пирофосфорилаза (К. Ф., 2.4.2.8), осуществляющий следующую реакцию:



Выделенную ДНК добавили к культуре клеток линии D98. АН-2, не способной к синтезу этого фермента. Это привело к появлению трансформированных клеток, содержащих ИМФ-пирофосфорилазу. Такие клетки обнаруживают, выращивая их в определенных селективных условиях. ДНК-аза снимала трансформирующую активность, РНК-аза же таким действием не обладала [21].

Имеются данные о возможности вызвать с помощью ДНК соматическую трансформацию одной породы уток в другую породу [27, 28]; однако пока еще эти данные не нашли подтверждения.

Явление трансдукции

Явления, аналогичные бактериальным трансформациям, были изучены на бактериофаговых системах, о которых мы уже рассказывали в главе IX. Если мутант *E. coli*, не синтезирующий тимина, заразить бактериофагом Т2, то в нем можно индуцировать способность синтезировать тимин. По-видимому, неспособность осуществить синтез тимина обусловлена отсутствием соответствующего фермента. Поскольку при заражении бактериальной клетки фагом в нее переходит только фаговая ДНК и не переходит белок, то именно ДНК, по-видимому, ответственна за процесс трансдукции. ДНК фага приносит с собой какой-то механизм, обеспечивающий образование фермента, необходимого для синтеза тимина. Однако бактериофаг лишь в том случае оказывается способным вызвать синтез нового соединения в бактерии-хозяине, если он предварительно культивировался на бактериях, способных к данному синтезу. Следовательно, процесс трансдукции аналогичен процессу трансформации [11, 22].

Сейчас получено много данных, подтверждающих, что при бактериальной трансформации ДНК действует как наследственный детерминант, вызывая необратимое изменение наследственных признаков клеток, аналогичное тем изменениям, которые имеют место при мутации. Бойвин [5] рассматривает этот процесс как направленную мутацию. Уже давно было известно, что в высших растениях и животных ДНК локализована в хромосомах и что в бактериях содержится ядерный материал и генетический аппарат, аналогичный таковому у высших организмов [1]. Поэтому есть все основания думать, что бактериальные трансформации свидетельствуют о том, что ДНК — это активный материал гена, что он может быть экстрагирован и очищен, сохраняя при этом свою генетическую функцию, и что он может проникнуть в гомологичную клетку и стать постоянной составной частью ее генетического аппарата.

Оказалось довольно трудно подтвердить эту гипотезу. Бойвин, однако, высказал предположение, что если у высших растений и животных ДНК действительно является активным материалом гена, то у каждого данного вида содержание ДНК в наборе хромосом должно быть постоянным. Так оно и оказалось, по крайней мере приблизительно.

ДНК клеточного ядра

Наиболее характерной составной частью клеточного ядра является ДНК. В обезжиренных головках сперматозоида лосося ее содержание может достигать 48,5% сухого вещества. Данные о содержании нуклеиновой кислоты в ядрах клеток в значительной степени зависят от метода выделения, и опубликованные величины колеблются в широких пределах. Обычно содержание нуклеиновых кислот в ядрах составляет около 30% сухого вещества.

В то время как от вида к виду среднее содержание ДНК в ядре сильно варьирует, для ядер различных соматических тканей данного вида оно, по-видимому, постоянно [64—67]. Вместе с тем количество ДНК в ядрах сперматозоидов, содержащих гаплоидный набор хромосом, примерно вдвое меньше, чем в ядрах соматических клеток того же вида. Эти наблюдения нашли подтверждение в работах других исследователей [69, 70] (табл. 23) и обсуждение в работах других исследователей [65]. Данные, имеющиеся в литературе, с позиций эволюционной теории [65]. Данные, имеющиеся по этому вопросу, собраны в специальном обзоре [71]. Как видно из таблицы, во всех тканях крысы содержится примерно по 6,7 $\mu\text{г}$ ДНК на ядро и только в тканях печени эта величина гораздо выше (9,4 $\mu\text{г}$). Причины этого явления мы рассмотрим дальше.

Таблица 23
Среднее содержание ДНК в клеточных ядрах

	Содержание ДНК на 1 ядро, пг (10-12 г)					
	крыса	домаш- няя птица	вол	ля- гушка	жаба	каrp
Печень	9,4	2,6	6,4	15,7	—	3,3
Почки	6,7	2,3	6,3	—	—	—
Селезенка	6,5	2,6	—	—	—	—
Легкие	6,7	—	—	—	—	—
Лейкоциты	6,6	—	—	—	—	—
Эритроциты	—	2,6	—	15,0	7,3	3,5
Сердце	6,5	2,5	—	—	—	—
Поджелу- дочная железа	7,3	2,7	—	—	—	—
Мозг	—	2,3 *	—	—	—	—
Мышцы	—	2,5 *	—	—	—	—
Сперма	—	1,3	2,8	—	3,7	1,6

* Зародыш цыпленка.

Ниже приводятся данные о содержании ДНК в фаговых ча-
стицах или ядрах (гаплоидные наборы) [68].

Объект	ДНК, пг
Бактериофаг T2	0,0002
<i>E. coli</i>	0,01
Губки	0,06
Кишечнополостные	0,3
Иглокожные	0,9
Костистые рыбы	0,5—1,5
Птицы	1,0—2,0
Черепахи	2,5
Млекопитающие	2,9—3,2
Лягушки	7,5
Двоякодышащие рыбы	50
Амфиумы	84

Приведенные величины показывают, в каких пределах может колебаться содержание ДНК в биологических объектах.

ДНК различных тканей одного и того же вида не различаются ни по своему содержанию в клетке, ни по своим свойствам. Так, например, ДНК, выделенные из различных тканей мышц, не отличаются друг от друга ни по среднему нуклеотидному составу, ни по плотности, ни по поведению при хроматографировании [125, 126].

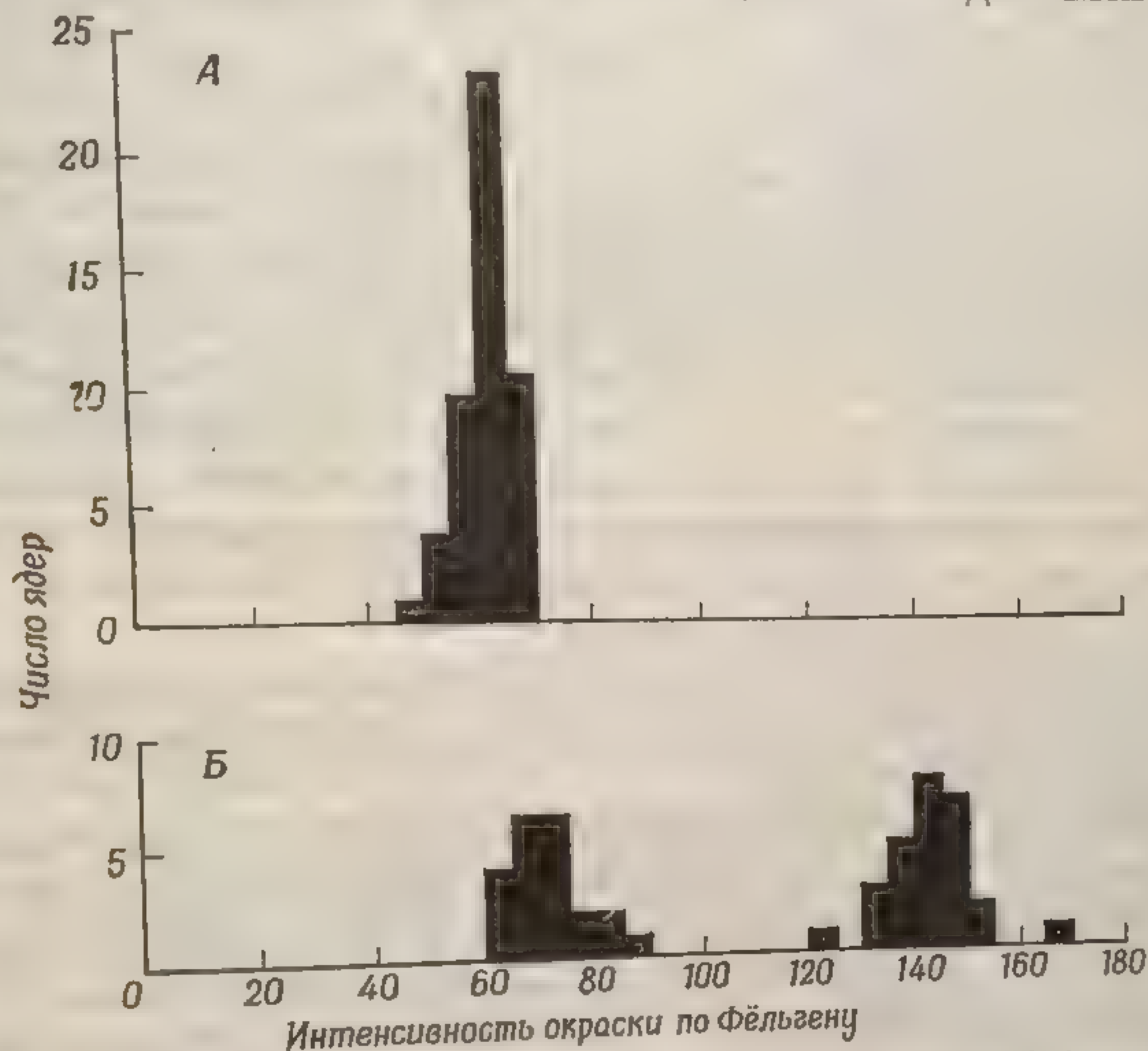
Приве
значения
няется с
были по
микроско
(стр. 123)

Фиг. 10

Данные
после п

Ядра
свете;
ядер л
метод
велич
но, пр
случа
колич
анализ
варьи
жани
Да
фиг. 1

Приведенные в табл. 23 данные представляют собой средние значения для всех ядер ткани и ничего не говорят о том, как изменяется содержание ДНК от ядра к ядру. Чтобы выяснить это, были поставлены опыты, в которых при помощи количественной микроспектрофотометрии, о которой мы уже говорили раньше (стр. 123), определяли содержание ДНК в отдельных ядрах.



Фиг. 104. Содержание ДНК в изолированных ядрах почки (А) и печени (Б) крысы.

Данные получены при помощи количественной микроспектрофотометрии после покраски по Фельгену. По оси абсцисс отложена интенсивность окраски по Фельгену в условных единицах (по данным Томсона).

Ядра фотометрируют или в ультрафиолетовом, или в видимом свете; в последнем случае используют предварительную покраску ядер либо метиловым зеленым, либо по Фельгену [72—75]. Эти методы имеют ряд серьезных ограничений [76] и всегда дают величины относительные, а не абсолютные. Однако они, бесспорно, пригодны для получения сравнительных данных. В отдельных случаях их удастся использовать для определения абсолютного количества ДНК в ядрах [73, 74]. Результаты фотометрических анализов свидетельствуют о том, что количество ядерной ДНК варьирует в очень узких пределах, хотя величина ядер и содержание белка в них могут очень сильно различаться [76].

Данные спектрофотометрических измерений показаны на фиг. 104. В верхней части рисунка (фиг. А) показано содержание

ДНК в 50 ядрах из почки крысы. Как видно из рисунка, эти ядра образуют весьма компактную группу.

Нижняя диаграмма (Б) сделана по результатам анализа 50 ядер, выделенных из печени; четко видно, что эти ядра распадаются на две основные группы. Меньшая группа ядер характеризуется таким же количеством ДНК, что и ядра почки; во второй, менее компактной группе среднее количество ДНК вдвое больше, чем в ядрах первой группы и в ядрах почек. В этом пике сосредоточены тетраплоидные ядра (ядра с двойным хромосомным набором), тогда как в первый пик попадают диплоидные ядра (с нормальным хромосомным набором), такие, которые обнаружены в большинстве других соматических тканей. Поскольку известно, что у грызунов в клетках печени обнаруживается полиплоидия, т. е. наличие ядер с кратным диплоидному набором хромосом, не удивительно, что при микроспектрофотометрическом анализе выявилось два класса ядер. Присутствие тетраплоидных ядер в печени крыс объясняет также, почему при химических анализах содержание ДНК в ядрах печени крыс оказывается гораздо выше [72, 77], чем в других тканях.

Такое высокое содержание ДНК не подвергается статистически значимым колебаниям даже при очень значительных изменениях в характере питания [70].

Явление полиплоидии обнаружено также в печени человека. До шестилетнего возраста у человека в печени содержатся только диплоидные ядра. Тетраплоидные ядра возникают в возрасте 11—14 лет, и к 20 годам их формирование заканчивается. К этому же времени появляются и октоплоидные ядра. В течение всей дальнейшей жизни человека в печени существуют одновременно все три класса ядер [78].

Концепция о постоянстве ДНК в ядре относится как к бактериальным, так и к животным клеткам. Показано, что содержание ДНК в отдельных клетках *Bacterium lactis aerogenes* не меняется при самых различных условиях культивирования, хотя размер клеток и содержание РНК при этом подвергаются большим колебаниям [79].

Такую стабильность содержания ДНК в ядре иногда весьма неудачно толкуют как обязательное постоянство количества ДНК в каждом неделящемся ядре. Химические методы могут дать только среднюю величину для всей популяции ядер; цитохимические методы показывают распределение внутри этой популяции. Обе группы методов показывают, что содержание ДНК варьирует в достаточно узких пределах, свидетельствуя о том, что содержание ДНК в клетке изменяется в меньшей степени, чем содержание любых других компонентов. Например, истинное содержание ДНК в популяции ядер (по данным спектрофотометрии)

может колебаться в пределах с 2000%-ной эритроциты. Стабильность в двух на количество содержание ДНК жать содержание. Тем самым ному расходу ДНК набором, асцитной

Поскольку содержание ДНК варьирует в определенной ткани содержание ДНК это происходит [81—83] в опытах человеческого ных изменений было во всем полученной ткани с составе малых количества количества. Многие в тех случаях, например, з очень много в железных клетках (фосфорисированные ДНК)

может колебаться в обе стороны от среднего арифметического в пределах 15% [72]. Колебания эти незначительны по сравнению с 2000%-ной разницей между содержанием белка в ядрах незрелых эритроцитов и нервных клеток у тех же видов.

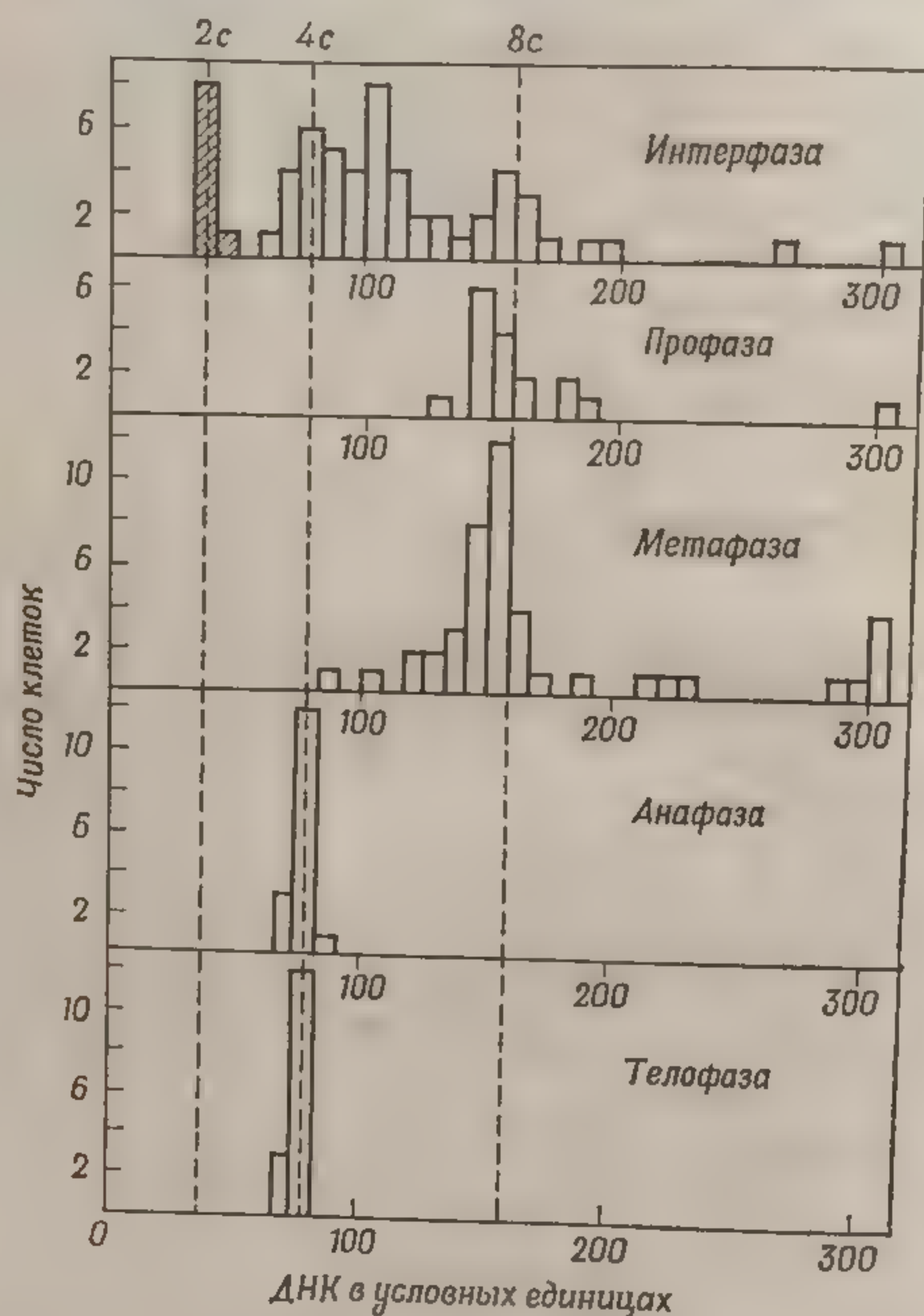
Стабильность содержания ДНК в ядре можно использовать в двух направлениях. Во-первых, она позволяет нам вычислить количество клеток в участке ткани, если известно общее содержание ДНК [69]. Во-вторых, по отношению к ДНК можно выражать содержание в ткани остальных соединений (стр. 109). Тем самым можно избежать некоторых ошибок, присущих обычному расчету на сырой или сухой вес [69, 70]. В целом количество ДНК в ядре клетки полностью коррелирует с хромосомным набором, что было очень четко продемонстрировано на клетках асцитной опухоли [80].

Изменения ДНК в ходе митотического деления

Поскольку для каждого вида характерно определенное содержание ДНК в клеточном ядре и поскольку содержание это варьирует в очень узких пределах, то естественно, что в быстро растущей ткани должен наступать в митотическом цикле период, когда содержание ДНК в клетке удваивается. По-видимому, удвоение это происходит в интерфазе или непосредственно перед профазой [81—83]. Справедливость этого предположения была доказана в опытах, проведенных Ричардсом [84]. С помощью фотоэлектрического сканирующего устройства он добился гораздо более точных измерений содержания ДНК в митотических ядрах, чем это было возможно раньше. На фиг. 105 приведена часть результатов, полученных им в опытах с асцитной опухолью Эрлиха. В этой ткани сами опухолевые клетки являются тетраплоидами. В качестве маркеров были использованы неопухолевые клетки воспалительного очага (заштрихованные), присутствующие в небольших количествах среди опухолевых клеток; они содержат диплоидное количество ДНК.

Многочисленные данные по включению метки показали, что в тех тканях, в которых деление клеток происходит редко (например, закончившая рост печень или почка), в целом наблюдается очень медленное включение предшественников пуриновых кислот в ДНК. Напротив, в слизистой оболочке кишечника, зубной железе, селезенке, костном мозгу и аппендиксе [85], т. е. там, где клетки делятся часто, включение идет достаточно интенсивно (фиг. 106). В печени мыши включение P^{32} как в ДНК, так и в РНК подвержено значительным суточным колебаниям [86], причем ДНК проявляет заметную метаболическую гетерогенность [87].

Для изучения биосинтеза ДНК в различных фазах митотического цикла очень удобен метод съемных пленок [81, 88—90]. Используя радиоавтографы, полученные этим методом, Говард и Пелк исследовали последовательность отдельных этапов в ходе синтеза ДНК в корнях конских бобов (*Vicia faba*) [92].



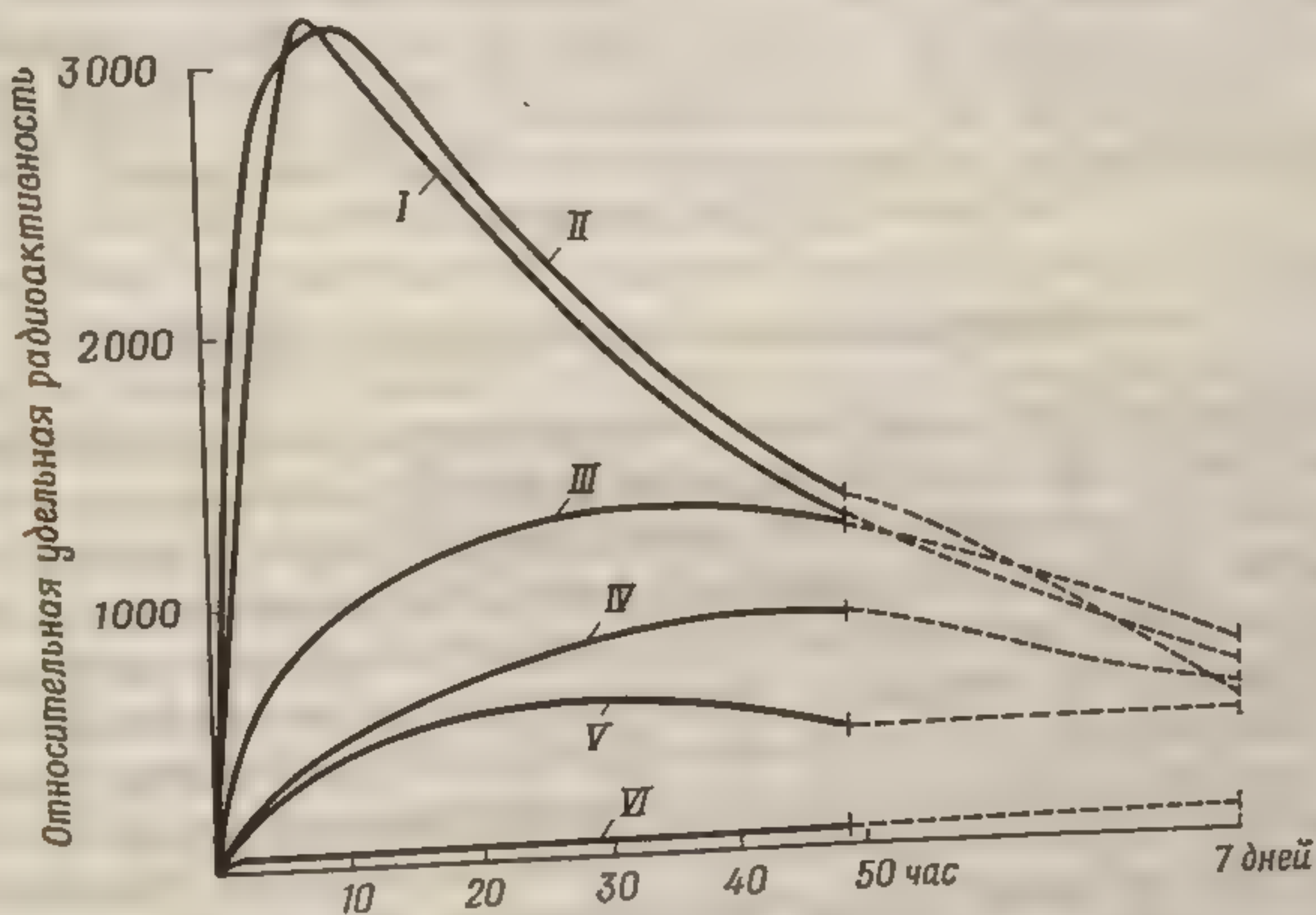
Фиг. 105. Содержание ДНК (в условных единицах) в клоне тетраплоидных клеток асцитного рака Эрлиха [84]. Опухолевые клетки не заштрихованы. Сопутствующие им неопухолевые «воспалительные» клетки служили эталоном диплоидного количества ДНК (заштриховано).

Как они установили, весь процесс синтеза ДНК распадается на несколько отдельных фаз. В ранней интерфазе наступает предсинтетическая фаза (G_1), после которой идет фаза синтеза (S); за фазой S следует новая предсинтетическая фаза (G_2) и после нее начинается митоз (M) (фиг. 107). Та же цикличность была обнаружена и при изучении клеток костного мозга *in vitro* [93] и кле-

ток асцитной опухоли Эрлиха [94]. Ниже приводится длительность (в часах) каждой фазы для всех трех типов клеток:

	G ₁	S	G ₂	M
Корни бобов	12	6	8	4
Костный мозг	25—30	12—15	3—4	1—2
Опухоль Эр- лиха	—	12	6	0,5

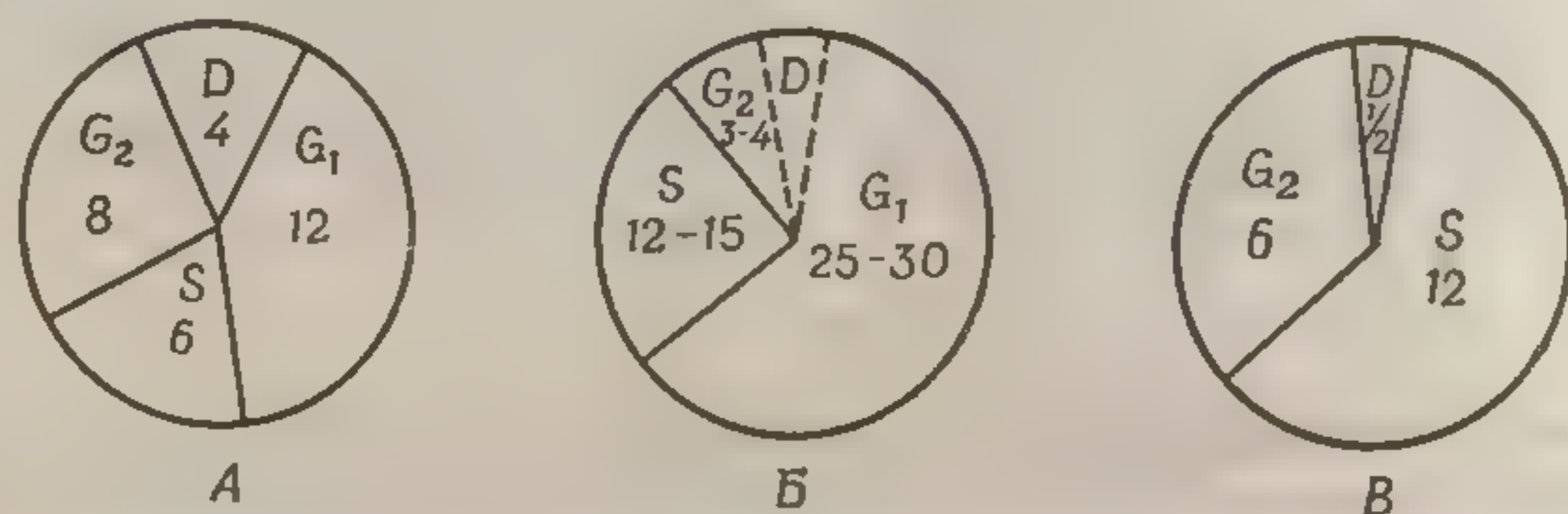
Распределение вновь синтезированной ДНК между дочерними ядрами было изучено Тэйлором [96, 97], использовавшим тимидин, меченный тритием, для изучения синтеза ДНК в корнях проростков бобов. Дочерние хромосомы, образующиеся путем удвоения



Фиг. 106. Включение P^{32} in vivo в ДНК разных тканей крысы после введения изотопа [85].
I — аппендикс; II — костный мозг; III — зубная железа; IV — слизистая кишечника; V — селезенка; VI — почка.

в присутствии H^3 -тимидина, оказались мечеными в равной степени и равномерно. При последующем же удвоении, протекавшем в отсутствие H^3 -тимидина, метка включалась только в одну из каждой пары дочерних хромосом. Из этих результатов следует, что ДНК синтезируется в виде целой нити, которая тянется по всей длине хромосомы, и что при последующих репликациях ее целостность не нарушается (ср. опыты Мезельсона и Сталя, стр. 195). Кроме того, эти данные говорят и о том, что в ходе митоза вновь синтезированная ДНК распределяется между дочерними хромосомами поровну. Однако интерпретировать такие радио-

автографические данные нелегко, и тема эта служит предметом многих разногласий [98].



Фиг. 107. Митотические циклы, рассчитанные по данным радиоавтографии [95].

А. Меристема корня бобов [92]. Б. Костный мозг человека [93]. В. Асцитный рак Эрлиха у мыши [94]. Цифры на рисунке показывают время в часах. Общая продолжительность митотического цикла составляет 30 час (А); 40—45 час (Б) и 18 час (В). D — митотические деления; S — включения изотопа в ДНК; G₁ и G₂ — периоды ранней и поздней интерфазы, в течение которых ДНК не включает метку.

Метаболическая стабильность ДНК

Генетическая роль ДНК подтверждается также характером ее метаболизма. Уже давно было показано [30—34], что в неделящихся клетках не происходит включения P^{32} и меченого аденина в ядерную ДНК. Последующие опыты с C^{14} -формиатом в качестве предшественника доказали, что находящаяся в покое печень крысы или кролика *in vivo* и *in vitro* включает лишь незначительные количества изотопа в пурины ДНК [35, 62]. В такого рода исследованиях нужны самые строгие меры предосторожности, чтобы быть уверенным в том, что пурины, активность которых определяют, совершенно не содержат радиоактивных примесей, например следовых количеств аминокислот.

Аналогичные данные были получены при обследовании больных лейкозом, которым в течение года вводили терапевтические дозы P^{32} . У таких людей не было обнаружено никакого заметного включения изотопа в ДНК мозга, хрящей и скелетной мускулатуры [36]. Такие же результаты были получены методом автографии.

Однако имеются указания на то, что в присутствии опухоли или развивающегося в утробе матери плода значительно усиливается включение P^{32} в ДНК остальных тканей [37—41, 53]. Так, например, у мыши с карциномой грудной железы, а также у беременных мышей и кроликов ДНК печени, селезенки и почек включают изотоп гораздо интенсивнее, чем у соответствующих контрольных животных. Этот эффект наблюдался как при использовании C^{14} -формиата и C^{14} -глицина в качестве предшественников

ДНК, так и при использовании P^{32} . На ДНК кишечника эффект этот не распространяется; не проявляется он и в отношении РНК.

Более того, в условиях парабноза, при котором одна из крыс-партнеров подвергается гепатэктомии, после введения C^{14} -оротовой кислоты удельная радиоактивность ДНК в печени второго партнера оказывается в 6 раз выше, чем в печени контрольной крысы (контролем служила питаемая крыса) [42].

Чтобы получить более прямые данные о метаболической стабильности ДНК, создают такие условия, в которых растущие клетки включают в свою ДНК меченый предшественник; затем наблюдают, в какой степени изотоп задерживается в ДНК после того, как введение метки прекращается. Такого рода опыты с *E. coli* [43, 44] показали, что в меченой ДНК атомы фосфора или углеродные атомы пуринов и пиримидинов не замещаются в течение последующего роста. Однако имеются данные о том, что в неделящихся клетках *E. coli* все же могут происходить такие замещения в тимине и в 5-бромурациле [45].

Подобные же результаты были получены и в опытах с печенью крыс, регенерирующей после частичной гепатэктомии (стр. 111). В течение периода регенерации происходит быстрый рост клеток и интенсивное их деление; максимум митозов наблюдается через 24 час после операции. Если сравнить скорость накопления ДНК со скоростью ее синтеза, рассчитанной по включению P^{32} , получается хорошее совпадение данных, свидетельствующее, по-видимому, о том, что синтез ДНК необратим [46, 59]. На выраженную биохимическую стабильность ДНК указывает и то обстоятельство [48], что P^{32} [47] и C^{14} -аденин [34], включившиеся в ДНК в течение периода регенерации, остаются в ней затем без изменений.

Этот подход был затем широко использован Бартоном [49], введяшим через 12 час после частичной гепатэктомии одновременно P^{32} и C^{14} -глицин. Через 4 недели делали вторую частичную гепатэктомию. В удаленных тканях удельная радиоактивность P^{32} в ДНК оказалась приблизительно в 10 раз выше, чем в РНК. Аналогичная картина наблюдалась и в отношении C^{14} . В течение двух дней после второй операции уменьшение удельной радиоактивности C^{14} и P^{32} в печеночной ДНК было очень незначительным и было связано с пуринами во вновь синтезированной слабо меченой ДНК. Однако в течение периода регенерации после второй операции меченая ДНК не потеряла своей радиоактивности. Следовательно, можно полагать, что ДНК, однажды вошедшая в состав хромосом, остается биохимически стабильной даже во время удвоения хромосом и деления клеток.

Аналогичные результаты были получены с культурой L-клеток по Эрлу. В течение нескольких дней эти клетки инкубировали

с P^{32} и C^{14} -формиаом, после чего их пересадили на немеченую среду; здесь они росли в течение нескольких поколений. Хотя в этот «немеченый» период клеточные деления продолжались, метка, раз включившаяся в ДНК, сохранилась в ней вся, без малейших потерь [50, 51]. Такую же картину наблюдали и на клетках асцитной опухоли [52].

Таким образом, имеющиеся данные в совокупности дают основание думать, что ДНК метаболически гораздо более стабильна, чем другие компоненты клетки (хотя, возможно, она и не совсем метаболически инертна). Именно таким качеством и должна обладать ДНК, если она является генетическим веществом клетки [61].

Однако приведенные результаты не исключают, конечно, и той возможности, что в определенных типах клеток часть ДНК может быть метаболически активной [103, 121]. Такая активная ДНК была обнаружена в нескольких объектах, в том числе в овоцитах ряда насекомых [101], в растущих тканях высших растений [102] и в популяции бактерий [124].

Генетическая функция ДНК

Итак, мы располагаем многочисленными данными о том, что ДНК является носителем генетической информации. Благодаря своей комплементарной структуре ДНК замечательно подходит к этой роли. Ее способ репликации, при котором материнская молекула дает начало двум идентичным дочерним молекулам, гарантирует, что каждая клетка, образовавшаяся путем митоза, получает точно такой же по количеству и качеству набор хромосом, какой содержался в материнской клетке. Постоянство количества ДНК во всех покоящихся соматических клетках данного вида, удвоение этого количества перед делением, наличие половины его в клетках спермы, имеющих половинный набор хромосом, — все эти данные подтверждают основной вывод, хотя сами по себе отнюдь не являются решающими доказательствами. Основной вывод опирается и на хорошо известное соотношение между содержанием ДНК в клетке и числом хромосом, а также на твердо установленный факт локализации ДНК в хромосомах. Дальнейшие подтверждения базируются на данных по метаболической стабильности и на ряде наблюдений, показавших, что ДНК в отсутствие белка может действовать как инфекционный агент (стр. 157), передающий биологическую информацию. Однако наиболее убедительные доказательства были получены, безусловно, при изучении бактериальной трансформации.

Генетическая информация заложена, по-видимому, в последовательности четырех нуклеотидов (оснований), образующих полинуклеотидную цепь ДНК. Точно так же при письме информация

оказыва
составля
четыре
цепочки
Наприм
может б
но [112]
заключе
основан
буквенн
лать 100
Следова
ски бес
особями

Опыт
из разл
ДНК-аг
гомолог
ков ДН
довало
обезьян
никакой

Подс
и хомян
или кр
ДНК и
тики [1

В ка
две осн
в проце
в ней и
тате чеп
информ
на два

Сущ
и белк
показа
тельно
ний в
E. coli
с посл
фермен
ших с
к пор
мутац

оказывается заключенной в последовательности букв алфавита, составляющих слова. Число возможных сочетаний, в которых четыре нуклеотида могут быть «набраны» на протяжении всей цепочки ДНК, достигает буквально астрономических цифр. Например, короткая молекула всего лишь из 100 нуклеотидов может быть набрана 4^{100} различными способами. Было подсчитано [112], что закодированная в яйцеклетке человека информация заключена приблизительно в 100 000 генов, состоящих из 5 млрд. оснований ДНК. Из них можно составить 1 700 000 000 трехбуквенных слов, из которых в свою очередь можно было бы сделать 1000 книг по 600 страниц с 500 словами на каждой странице. Следовательно, в структуре ДНК можно закодировать практически бесконечное разнообразие различий между видами и между особями внутри видов.

Опыты по гибридизации радиоактивных фрагментов ДНК из различных видов с ДНК тех же самых или других видов на ДНК-агаровых колонках (стр. 234) обнаружили существование гомологии в нуклеотидной последовательности отдельных участков ДНК из таких далеких форм, как рыба и человек. Как и следовало ожидать, человеческая ДНК гораздо ближе к ДНК обезьяны-резуса, чем к ДНК крысы или кролика, и не имеет никакого сходства с ДНК *E. coli*.

Подобным же образом родство между ДНК мыши, крысы и хомяка гораздо теснее, чем родство этих ДНК с ДНК человека или кролика [99]. Разумеется, выяснение видовых особенностей ДНК в будущем приобретет огромное значение для систематики [100].

В качестве носителя генетической информации ДНК выполняет две основные функции: 1) снимает с самой себя точные копии в процессе удвоения, или репликации, и 2) передает заключенную в ней информацию на *m*-РНК в процессе транскрипции, в результате чего *m*-РНК в свою очередь может транслировать (переводить) информацию с четырехбуквенного языка нуклеиновых кислот на двадцатибуквенный язык аминокислот и белков.

Существование зависимости между линейной структурой гена и белка было обнаружено в опытах Яновского [109—111, 123], показавшего, как можно проследить связь между последовательностью аминокислот в белке и последовательностью оснований в ДНК. Он использовал фермент триптофансинтетазу из *E. coli*, чтобы сравнить пункт за пунктом генетическую карту с последовательностью аминокислот на соответствующем участке ферментного белка. В частности, он изучил два мутанта, утративших свою ферментативную активность, но способных вернуться к нормальному функционированию в результате следующей мутации. Например, у дикого штамма *E. coli* в одном месте поли-

пептидной цепи фермента находится аминокислота глицин (код УГГ). У одного из мутантов глицин оказался замененным на глутамин (УГА), у другого — на аргинин (УЦГ). Эти замены вызваны изменением в каждом случае только одного основания в кодирующем триплете. При последующей мутации глутамин (УГА) может быть заменен на валин (УГУ), и при этом получается частичный ревертант, или на аланин (УГЦ) или глицин (УГГ) — полные ревертанты. Или же (во втором случае) аргинин может быть замещен на серин (УЦУ) или глицин (УГГ), что опять-таки приведет к полному восстановлению исходного типа.

Роль ДНК в наследственности обсуждается в многочисленных обзорах [9, 11, 17—19, 24, 29, 54—56, 60, 103—106, 112, 122, 128] и критических статьях [23, 107, 108, 120].

Иммунологические свойства ДНК

Иммунологические свойства ДНК еще не изучены. Однако вполне возможно, что они имеют большое значение при таких заболеваниях, как эритематозная волчанка [116, 117]. Образование антител, способных реагировать с денатурированной теплом ДНК, может быть вызвано путем иммунизации антигенами, приготовленными из белков, соединенных с пуринами и пиримидинами [113—115].

Цитоплазматическая наследственность

Как известно, основным носителем генетической информации является ДНК. Однако в некоторых твердо установленных случаях эту роль выполняет РНК [60]. Наилучшим примером могут служить мелкие вирусы (стр. 161) и цитоплазматические частицы в *Paramecium*, известные под названием метагонов [118].

Цитоплазматические гранулы, содержащие ДНК, также могут выполнять генетическую функцию; таковы, например, хлоропласты у растений (стр. 133) или капна-частицы у штаммов-«убийц» *Paramecium*. Однако в некотором отношении они больше похожи на паразитов.

Проблеме цитоплазматической наследственности посвящено несколько обзоров [119, 127].

ЛИТЕРАТУРА

1. Robinow C. F., in Dubos R. J., The Bacterial Cell, Harvard University Press, 1947.
2. Avery O. T., McCleod C. M., McCarty M., J. Exp. Med., 79, 137 (1944).
3. Alexander H. E., Leidy G., J. Exp. Med., 93, 345 (1951).

4. Zamenhof S., Leidy G., Alexander H. E., Fitzgerald P. L., Chargaff E., Arch. Biochem. Biophys., 40, 50 (1952).
5. Boivin A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12, 7 (1947); C. R. Soc. Biol., Paris, 142, 1258 (1948).
6. Hotchkiss R. D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 16, 505 (1951).
7. Hotchkiss R. D., Exp. Cell Res., Suppl. 2, 384 (1952).
8. Hotchkiss R. D., J. Cell Comp. Physiol., 45, Suppl. 2, 1 (1955).
9. Hotchkiss R. D., The Nucleic Acids (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), Vol. II, p. 435, New York, Academic Press (1955).
10. Hotchkiss R. D., Harvey Lectures, 49, 124 (1955).
11. Hotchkiss R. D., Enzymes: Units of Biological Structure and Function (O. H. Gaebler, Ed.), p. 119, New York, Academic Press (1956).
12. Hotchkiss R. D., Weiss E., Scientific American, 195, 48 (1956).
13. Brown G. L., Watson M., Nature, 172, 339 (1955).
14. Ephrussi-Taylor H., Exp. Cell Res., 2, 589 (1951).
15. Austrian R., Bact. Rev., 16, 31 (1952).
16. Zamenhof S., Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, Vol. VI, p. 86 (J. A. V. Butler, Ed.), London, Pergamon Press (1956).
17. Drysdale R. B., Peacocke A. R., Biol. Rev., 36, 537 (1961).
18. The Chemical Basis of Heredity (W. D. McElroy and B. Glass, Eds.), Baltimore, Johns Hopkins Press (1957). (Химические основы наследственности, М., ИЛ, 1960.)
19. Hershey A. D., Enzymes: Units of Biological Structure and Function (O. H. Gaebler, Ed.), p. 109, New York, Academic Press (1956).
20. Marmur J., Hotchkiss R. D., J. Biol. Chem., 214, 383 (1953).
21. Szybalska E. H., Szybalski W., Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 2026 (1962).
22. Zinder N. D., Sci. Amer., 199 (5), 38 (1958).
23. Chayen J., Exp. Cell Res., Suppl. 6, 115 (1958).
24. Gamow G., Sci. Amer., 194, 70 (1955).
25. Hotchkiss R. D., Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), Vol. III, p. 692 (1957).
26. Zamenhof S., Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds.), Vol. III, p. 696, New York, Academic Press (1957).
27. Benoit J., Leroy P., Vendrely C., Vendrely R., C. R. Acad. Sci., 244, 2321 (1957).
28. Benoit J. et al., C. R. Acad. Sci., 247, 1049 (1958).
29. Perutz M. F., New Scientist, 1192 (1959).
30. Hevesy G., Ottesen J., Acta Physiol. Scand., 5, 237 (1943).
31. Andreassen E., Ottesen J., Acta Physiol. Scand., 10, 257 (1945).
32. Hevesy G. C., J. Chem. Soc., p. 1618 (1951).
33. Furst S. S., Roll P. M., Brown G. B., J. Biol. Chem., 183, 251 (1950).
34. Furst S. S., Brown G. B., J. Biol. Chem., 181, 239 (1951).
35. Sibatani A., Biochim. Biophys. Acta, 25, 592 (1957).
36. Osgood E. E., Li J. G., Tivey H., Duerst M. L., Seaman A. J., Science, 114, 95 (1951).
37. McIndoe W. M., Davidson J. N., Brit. J. Cancer, 6, 200 (1952).
38. Smellie R. M. S., McIndoe W. M., Logan R., Davidson J. N., Dawson I. M., Biochem. J., 54, 280 (1953).
39. Payne A. H., Kelly L. S., Beach J., Jones H. B., Cancer Res., 12, 426 (1952).

40. Payne A. H., Kelly L. S., Entenman C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 81, 698 (1952).
41. Kelly L. S., Payne A. H., White M. R., Jones H. B., Cancer Res., 11, 694 (1951).
42. Van Lancker J. L., Sempoux D. G., Arch. Biochem. Biophys., 80, 337 (1959).
43. Hershey A. D., J. Gen. Physiol., 38, 145 (1954).
44. Fujisawa Y., Sibatani A., Experientia, 10, 178 (1954).
45. Zamenhof S., Reiner B., de Giovanni R., Rich K., J. Biol. Chem., 219, 165 (1956).
46. Nygaard O., Rusch H. P., Cancer Res., 15, 240 (1955).
47. Brues A. M., Tracy M. M., Cohn W. E., J. Biol. Chem., 155, 519 (1944).
48. Fresco J. R., Bendich A., Russell P. J., Fed. Proc., 14, 214 (1955).
49. Barton A. D., Fed. Proc., 13, 422 (1954).
50. Healy G. M., Simonovitch L., Parker R. C., Graham A. F., Biochim. Biophys. Acta, 20, 425 (1956).
51. Thomson R. Y., Paul J., Davidson J. N., Biochem. J., 69, 553 (1958).
52. Laszlo R., Forssberg A., Klein G., J. Nat. Can. Inst., 17, 37 (1956).
53. Griffin A. C., Texas Reports on Biol. and Med., 15, 161 (1957).
54. Brachet J., Biochemical Cytology, New York, Academic Press (1957).
55. Brachet J., Les Nucleoproteins, Onzième Conseil de Chimie, Institut de Chimie Solvay, pp. 1—24, Bruxelles, R. Stoepe (1959).
56. Fincham J. R. S., Ann. Rev. Biochem., 28, 343 (1959).
57. Kit S., Griffin A. C., Cancer Res., 18, 621 (1958).
58. Chargaff E., Schulman H. M., Shapiro H. S., Nature, 180, 851 (1957).
59. Ives D. H., Barnum C. P., J. Biol. Chem., 237, 2604 (1962).
60. Zamenhof S., The Chemistry of Heredity, Oxford, Blackwell (1959).
61. Hughes W. L., Kinetics of Cellular Proliferation (F. Stohlman, Ed.), New York, Grune and Stratton (1959).
62. Fresco J. R., Bendich A., J. Biol. Chem., 235, 1124 (1960).
63. Stedman E., Stedman E., Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 232 (1947).
64. Vendrely R., Vendrely C., Experientia, 4, 434 (1948); *ibid.*, 5, 327 (1949).
65. Boivin A., Vendrely R., Vendrely C., C.R. Acad. Sci., 226, 1061 (1948).
66. Mirsky A. E., Ris H., Nature, 163, 666 (1949).
67. Mirsky A. E., Ris H., J. Gen. Physiol., 34, 451 (1951).
68. Sinsheimer R., Science, 125, 1123 (1957).
69. Davidson J. N., Leslie I., Nature, 165, 49 (1950); Cancer Res., 10, 587 (1950).
70. Thomson R. Y., Heagy F. C., Hutchison W. C., Davidson J. N., Biochem. J., 53, 460 (1953).
71. Vendrely R., The Nucleic Acids, Vol. 2, p. 155 (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), New York, Academic Press (1955).
72. Pollister A. W., Swift H., Alfert M., J. Cell Comp. Physiol., 38, Suppl. 1, 101 (1951).
73. Kurnick N. B., Exp. Cell Res., 1, 151 (1950).
74. Leuchtenberger C., Leuchtenberger R., Vendrely C., Vendrely R., Exp. Cell Res., 3, 240 (1952).
75. Schrader R., Leuchtenberger C., Exp. Cell Res., 1, 421 (1950).

113. Beiser S. M., Tannenbaum S. W., Erlanger B. F., Nature, 203, 1381 (1964).
114. Erlanger B. F., Beiser S. M., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 68 (1964).
115. Tannenbaum S. W., Beiser S. M., Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 662 (1963).
116. Grossman L., Stollar D., Herrington K., Deoxyribonucleic Acid: Structure Synthesis and Function, p. 200, London, Pergamon Press (1962).
117. Stollar D., Levine L., Arch. Biochem. Biophys., 101, 353 (1963).
118. Beale G. H., Cellular Control Mechanisms and Cancer, p. 8 (P. Emmelet and O. Muhlbock, Eds.) (1964).
119. Wilkie D., The Cytoplasm in Heredity, London, Methuen, 1964.
120. Commoner B., Amer. Scientist, 52, 365 (1964).
121. Pelc S. R., J. Cell Biol., 22, 21 (1964).
122. Hayes W., The Genetics of Bacteria and their Viruses, Oxford, Blackwell, 1964. (Хейс У., Генетика бактерий и бактериофагов М., «Мир», 1965.)
123. Yanofsky C., Carlton B. C., Guest J. R., Helinski D. R., Henning U., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 266 (1964).
124. Contois D. E., Seymour W. F. K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 124 (1964).
125. Kit S., Arch. Biochem. Biophys., 87, 318 and 330 (1960).
126. Kit S., J. Biol. Chem., 235, 1756 (1960).
127. Sager R., Scientific American (January), p. 70 (1965).
128. Crick F. H. C., Proc. 6th Internat. Cong. Biochem., 33, 109 (1964).

О то
еще мо
свидете
соответ
превра
различ
дуальн
ляются

В п
момента

1. Е
гидрол
вновь и

2. П
в проц
дается
что ДН
в ткан
при н
печень
леазы,
[20—2

Ну
с пище
ляемы
зуются
свобод
дают з
нуклео
ствии

Ра
быть
аденаз
21 Дж.

ГЛАВА XV

КАТАБОЛИЗМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Введение

О точном механизме распада нуклеиновых кислот *in vivo* пока еще можно строить предположения. Однако имеющиеся данные свидетельствуют о том, что РНК и ДНК сначала гидролизуются соответственно РНК-азой и ДНК-азой, что продукты их распада превращаются в мононуклеотиды, которые затем, с помощью различных фосфатаз, превращаются в нуклеозиды. Индивидуальные пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды потом расщепляются. Эти реакции будут разобраны ниже.

В последнее время внимание исследователей привлекают два момента в ходе распада нуклеиновых кислот:

1. Было выдвинуто предположение о том, что часть продуктов гидролиза РНК и ДНК может избежать полной деградации и быть вновь использована на синтез новых молекул полинуклеотидов [19].

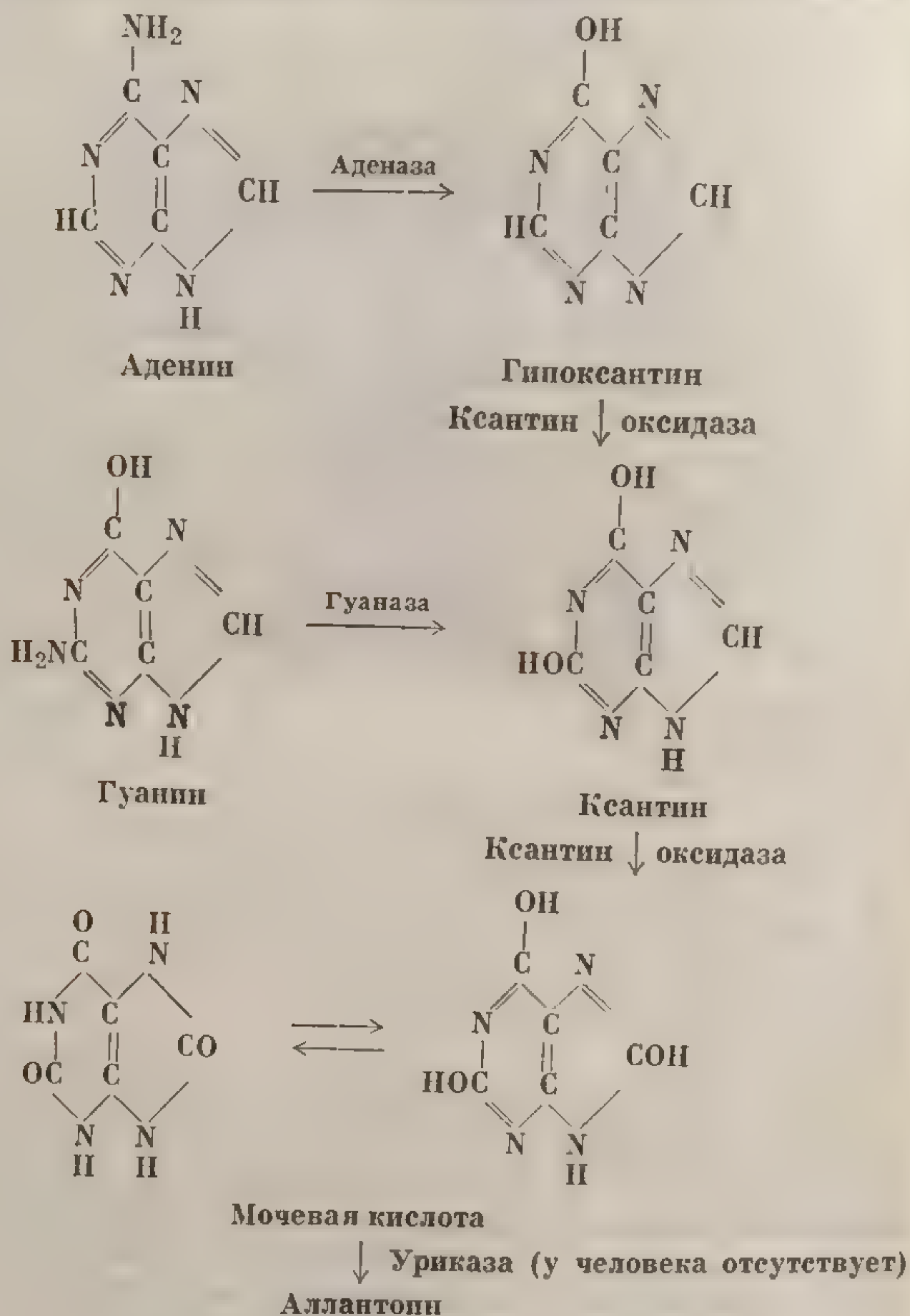
2. Поскольку имеются веские доводы в пользу того, что ДНК в процессе жизни клетки либо совсем не распадается, либо распадается в незначительной степени, вызывает удивление тот факт, что ДНК-аза в высоких концентрациях широко распространена в тканях животных. Особенно интересно следующее наблюдение: при незлокачественном росте (плацента или регенерирующая печень крысы) очень усиливается активность дезоксирибонуклеазы, в то время как при злокачественном росте она не меняется [20—22].

Нуклеиновые кислоты, попадающие в организм животного с пищей, распадаются в кишечнике под влиянием нуклеаз, выделяемых в кишечнике и поджелудочной железе. При этом образуются фосфорная кислота, свободные основания и, по-видимому, свободные сахара. Пуриновые и пиримидиновые основания попадают затем в кровь и могут быть либо использованы на синтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот, либо распадаться в соответствии с приведенным ниже ходом реакций.

Катаболизм пуринов

Распад пуринов изучен подробно. Аденин, например, может быть гидролитически дезаминирован под действием фермента аденазы с образованием гипоксантина, тогда как гуанин гидро-

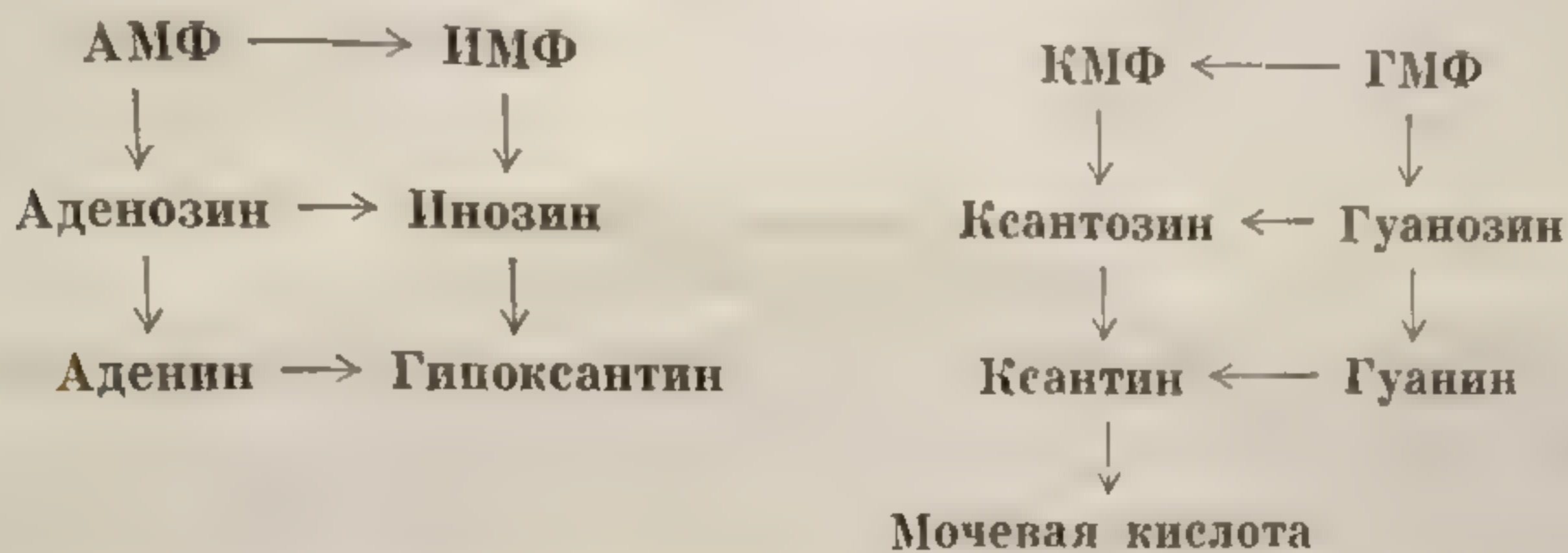
литически дезаминируется гуаназой с образованием ксантина (фиг. 108). Подобный распад может происходить также на нуклеозидном и нуклеотидном уровнях (фиг. 109). Гипоксантин и ксантин затем окисляются в присутствии ксантиноксидазы до мочевого



Фиг. 108. Распад пуринов.

кислоты (фиг. 108). Эта схема распада пуринов распространена очень широко, хотя у различных видов по-разному представлены ферменты, участвующие в ее осуществлении. Недавно проведенные эксперименты подтвердили, как и следовало ожидать, что

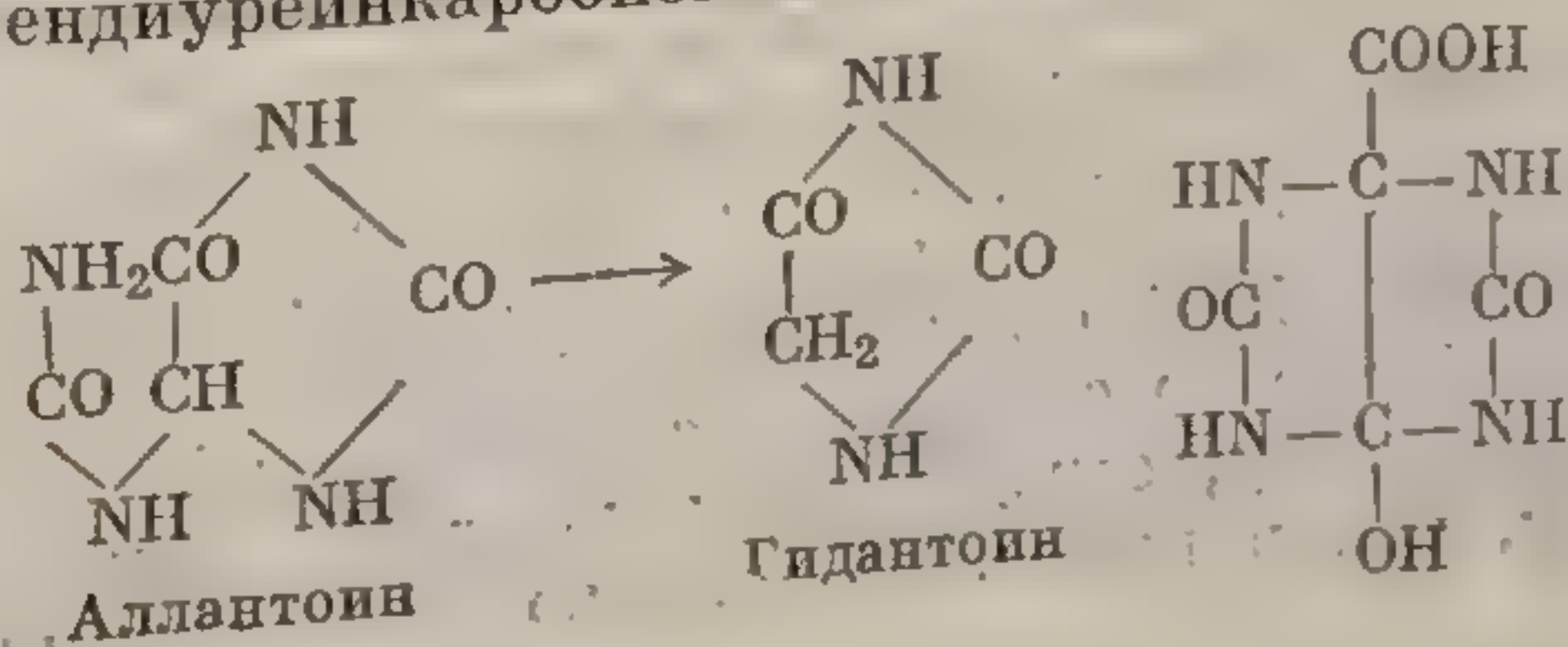
при введении животным N^{15} -пуринов изотоп обнаруживается в выделяющейся мочевой кислоте или дальнейших продуктах ее распада. Мочевая кислота как таковая выделяется только у некоторых млекопитающих. У большинства же млекопитающих имеется фермент уриказа, который окисляет мочевую кислоту до гораздо более растворимого аллантиина и других (при определенных условиях) конечных продуктов [10]. У людей



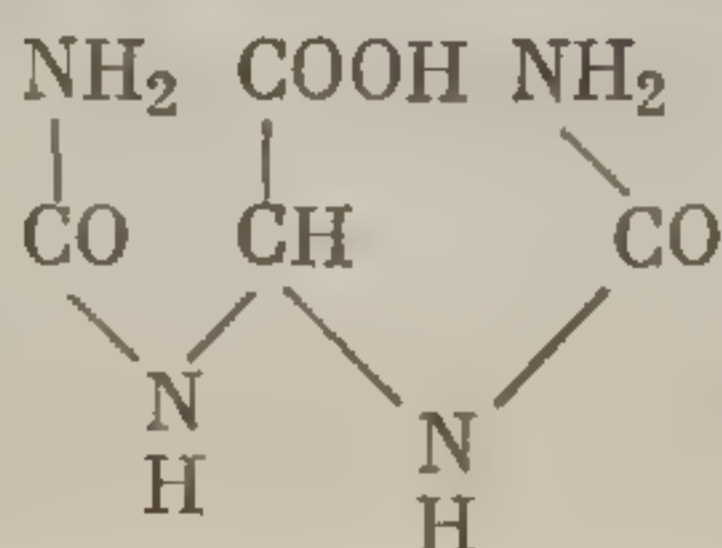
Фиг. 109. Распад пуринов на уровне нуклеотидов, нуклеозидов и оснований.

и некоторых высших обезьян уриказа в тканях отсутствует и соответственно не происходит дальнейшего окисления мочевой кислоты. Поэтому в данном случае конечным продуктом пуринового метаболизма является сама мочевая кислота. У далматских догов выделение мочевой кислоты преобладает над выделением аллантиина, однако у них это связано с тем, что в почечных канальцах этих животных не происходит обратного поглощения мочевой кислоты.

Если скормить крысам аденин [2] или мочевую кислоту [3], меченные N^{15} по положениям 1 и 3, то, разумеется, изотоп будет обнаружен в выделившемся аллантиине. Если этот аллантиин выделить и перевести в гидантоин, то содержание изотопа в гидантоине будет таким же, как и в аллантиине. N^{15} , первоначально находившийся в положениях 1 и 3 пуринового кольца, должно быть, затем равномерно распределился между имидазольной и мочевиной половинами аллантиина. Следовательно, превращение мочевой кислоты в аллантиин включает образование симметричного промежуточного продукта, такого, например, как оксинацетилендиуреинкарбоновая кислота [2, 3, 11].



У рыб, земноводных и у более примитивных организмов аллантоин может под действием *аллантоиназы* расщепиться до аллантоиновой кислоты, которая в свою очередь может под действием *аллантоиказы* распасться до мочевины и глиоксиловой кислоты



Аллантоиновая кислота

Эти вопросы сравнительной биохимии детально обсуждаются в монографиях Болдуина [12] и Флоркена [13].

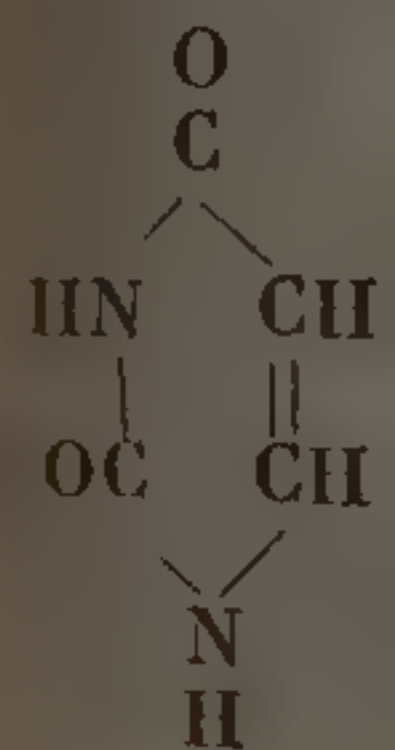
Чаще всего мы сталкиваемся с мочевой кислотой у птиц и урикотелических пресмыкающихся, так как у них основным азотистым продуктом обмена является мочевая кислота, а не мочевина. У большинства птиц образование мочевой кислоты происходит в печени: гепатозктомия приводит у них к тому, что синтез мочевой кислоты прекращается, а содержание аммонийного азота в крови повышается. Опыты с изотопами подтвердили, что у птиц и пресмыкающихся, как и предполагалось, предшественником мочевой кислоты служит аммиак. Мочевина не играет роли предшественника мочевой кислоты и может быть использована только как источник аммиака. В то время как в печени домашней птицы содержатся все ферменты, необходимые для образования мочевой кислоты, в печени голубя отсутствует ксантиноксидаза. Поэтому у голубей гипоксантин образуется в печени, а окисление его в мочевую кислоту происходит в почках, где ксантиноксидаза имеется.

Распределение изотопа в моче здоровых людей, получавших внутривенно N^{15} -мочевую кислоту, показало, что введенная кислота сразу же разбавляется в общем фонде мочевой кислоты (доходящем до 1 г) [4, 6, 8]. Поскольку скорость образования мочевой кислоты, рассчитанная по скорости уменьшения концентрации изотопа, превышает скорость выделения мочевой кислоты более чем на 20%, можно думать, что у человека часть мочевой кислоты подвергается катаболическому распаду.

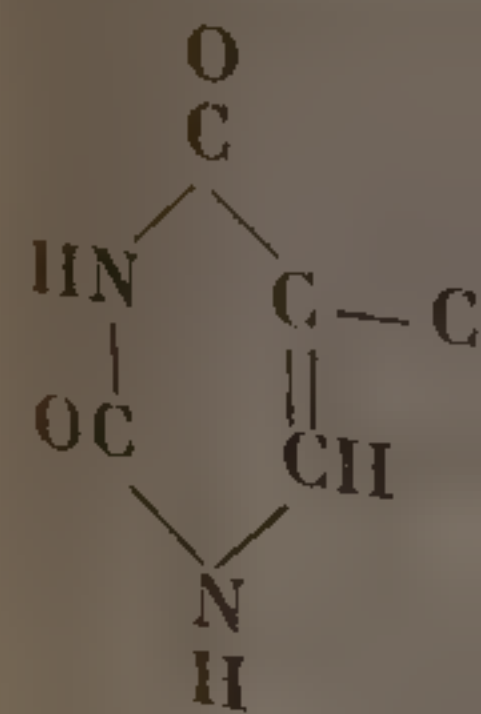
При некоторых заболеваниях, например при подагре, мочевая кислота откладывается в суставах, особенно в большом пальце ноги, а также под кожей в виде узелков, называемых тофи. При этом заболевании общий фонд мочевой кислоты в организме увеличивается в 15 раз по сравнению с контролем [4, 7]. Введение N^{15} -глицина человеку, страдающему подагрой, привело к более интенсивному, чем в норме, включению изотопа в выделяемую

мочевую кислоту при этом у больных в мочевую кислоту вследствие и увеличения. Интересно в в катаболизме [14—16].

Катаболизм в тканях мочевых кислот до и в процессе со



Урацил



Тимин

Фиг. 1

и CO_2 ; в р производн При с соотношен способност эта закон синтез РН

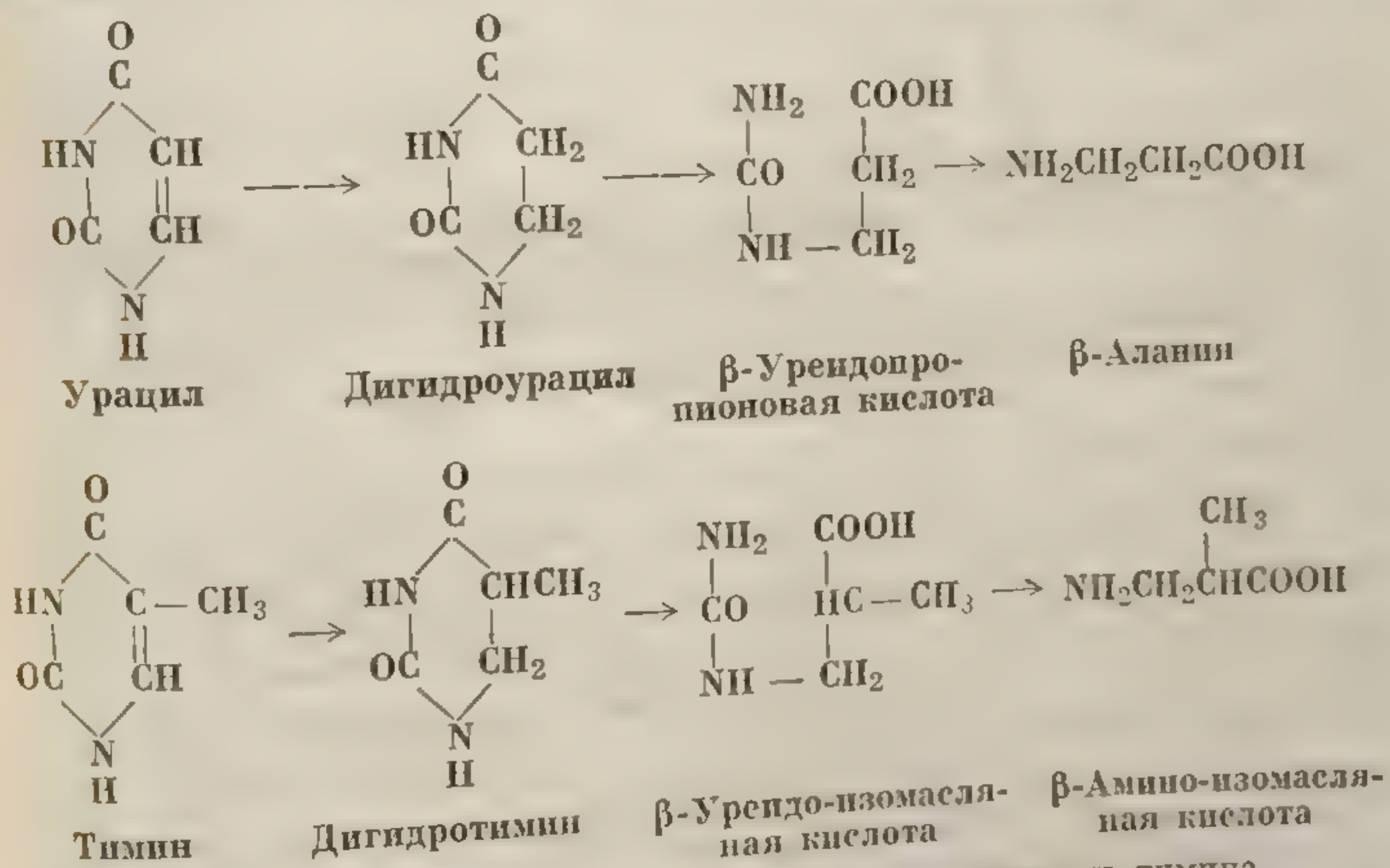
мочевую кислоту, хотя выделение общего азота, мочевины и аммиака при этом не изменилось [5]. Отсюда был сделан вывод, что у больных подагрой превращение введенного с пищей глицина в мочевую кислоту протекает быстрее, чем у здоровых людей. Вследствие этого наблюдается перепроизводство мочевой кислоты и увеличение ее общего фонда.

Интересно отметить, что у пауков азот выделяется преимущественно в виде гуанина, а не мочевой кислоты.

Катаболизм пуринов рассматривается во многих обзорах [1, 9, 14—16].

Катаболизм пиримидинов

Катаболитические превращения урацила [16] и тимина [17, 18] в тканях млекопитающих заключаются в восстановлении пиримидинов до их дигидропроизводных, размыкании кольца с образованием соответствующих уреидокислот и выделении аммиака



Фиг. 110. Катаболитические превращения урацила и тимина.

и CO₂; в результате образуются β-аланин или его метилированное производное (фиг. 110).

При сравнении различных тканей обнаруживается обратное соотношение между их способностью расщеплять урацил и их способностью включать урацил в свою РНК [17]. Возможно, что эта закономерность связана с механизмами, регулирующими синтез РНК.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bendich A., Getler H., Brown G. B., J. Biol. Chem., 177, 565 (1949).
2. Brown G. B., Roll P. M., Plentl A. A., Cavalieri L. F., J. Biol. Chem., 172, 469 (1948).
3. Brown G. B., Roll P. M., Cavalieri L. F., J. Biol. Chem., 171, 835 (1947).
4. Benedict J. D., Forsham P. H., Stetten D., J. Biol. Chem., 183 (1949).
5. Benedict J. D., Roche M., Yü T. F., Bien E. J., Guttman A. B., Stetten D., Metabolism, 1, 3 (1952).
6. Buzard J., Bishop C., Talbott J. H., J. Biol. Chem., 196, 179 (1952).
7. Bishop C., Garner W., Talbott J. H., J. Clin. Invest., 30, 879 (1951).
8. Geren W., Bendich A., Bodansky O., Brown G. B., J. Biol. Chem., 183, 21 (1950).
9. Smellie R. M. S., The Nucleic Acids (E. Chargaff and J. N. Davidson, Eds.), Vol. II, p. 393 (1955).
10. Canellakis E. S., Cohen P. P., J. Biol. Chem., 213, 385 (1955).
11. Dalglish C. E., Neuberger A., J. Chem. Soc., p. 3407 (1954).
12. Baldwin E., An Introduction to Comparative Biochemistry, London, Cambridge University Press, 1949.
13. Florkin M., Biochemical Evolution, New York, Academic Press, 1949.
14. Christman A. A., Physiol. Rev., 32, 303 (1952).
15. Laskowski M., The Enzymes (J. B. Sumner and K. Myrbäck, Eds.) Vol. I, Part 2, p. 956, New York, Academic Press (1951).
16. Schulman M. P., Chemical Pathways of Metabolism (D. M. Greenberg, Ed.), Vol. II, p. 223, New York, Academic Press (1954).
17. Canellakis E. S., J. Biol. Chem., 227, 701 (1957).
18. Fink K., Cline R. E., Henderson R. B., Fink R. M., J. Biol. Chem., 221, 425 (1956).
19. Thomson R. Y., Paul J., Davidson J. N., Biochem. J., 69, 553 (1958).
20. Brody S., Thorell B., Biochim. Biophys. Acta, 25, 579 (1957).
21. Brody S., Balis M. E., Nature, 182, 940 (1958).
22. Brody S., Balis M. E., Cancer Res., 19, 538 (1959).

Агар
Адап
PII
Адап
Адеп
Аден
Аден
Аден
175
Аден
Аден
Аден
АДФ
8-Аз
6-Аз
Азас
4-Аз
4-Аз
Азот
Акри
Акти
Акти
24
Аки
Р
β-Аз
Али
Алл
Алл
Алл
Алл
Алл
Аме
Ами
5-А
(
5-А
Р
5-А
Ам
Ам
Ам
—

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агар 42, 234, 244
 Адапторная РНК см. Растворимая РНК
 Адапторы 270
 Аденаза 321
 Адениловая кислота 23
 Аденилосукцинат-лиаза 176
 Аденилосукцинат кислота (АМФС) 175, 176
 Аденин 11, 17, 65
 Аденинполирибонуклеотиды 235
 Аденозин 21
 Аденозин-5'-фосфат 23
 АДФ 24
 8-Азагуанин 28, 291
 6-Азагуанозинфосфат 235
 Азасерин 176
 4-Азаурацил 218
 4-Азауридинмонофосфат 218
 Азотистая кислота 275
 Акридин 220
 Активация аминокислот 267
 Актиномицин D 220, 234, 235, 243, 246—248
 Акцепторная РНК см. Растворимая РНК
 β -Аланин 325
 Алкилирующие агенты 219
 Аллантоиказа 324
 Аллантоин 167, 323
 Аллантоиназа 324
 Аллоксан 167
 Аллостерические участки 285
 Амептерин 176
 Амидофосфорибозил-трансфераза 173
 5-Амино-4-имидазолкарбоксамид (АИКА) 169, 170
 5-Амино-4-имидазолкарбоксамид-рибонуклеотид (АИКАР) 170—172
 5-Аминоимидазолрибонуклеотид 174
 Аминоптерин 176
 АМФ 24, 25
 Антибиотики 220
 — устойчивость 301
 Антиген 292
 Антикодон 59, 268
 Антитела 292, 316
 Апорепрессоры 285
 Апуриновая кислота 80
 Аргинин 273
 Аспарагиновая кислота 168, 169
 Асцитная опухоль Эрлиха 309, 311
 Атомная экстинкция, коэффициент 35
 А — Т-пары 204
 АТФ 24, 172
 Ауреомицин 270
 Ацетатный буфер 121
 Ацетилирование 236
 Бактериальная клетка 129
 — трансформация 305
 Бактериофаг(и) 157
 — РНК 160, 248
 — MS2 59
 — SP8 79
 — T2 74, 241, 304
 — α 237
 — λ 72
 — фХ174 72, 80, 160, 201, 214, 231, 237, 238
 Белки, содержание в пище 288
 — синтез 264
 — — в ядре 287
 — — регуляция 283
 Белоксинтезирующая система 273
 Бентонит 41, 246
 Бескапсульные бугорчатые клетки 300
 Биосинтез, см. по названиям
 Ближайшего соседствования анализ 204—208, 231
 5-Бромдезоксинуридин 223
 5-Бромдезоксинуридинтрифосфат 204
 5-Бромдезоксидитидинтрифосфат 204
 5-Бромуридинмонофосфат 235
 5-Бромурацил 197, 217

- Вакуоль 126
 Валинспецифическая s-РНК 43
 Винбластин 220
 Вирус(ы) 151
 — животных 155
 — насекомых 154
 — некроза табака 273
 — папилломы 196
 — полиомы 72, 196
 — растений 152
 — — сферические 154
 — репликативная форма 59, 214, 238
 — РНК 59
 — табачной мозаики 152, 251, 275
 — ЕМС 247, 251
 Вирусы-сателиты 273
 Вторичная структура РНК 55
- β-Галактозидаза 277, 281, 286
 Галактозидпермеаза 286
 β-Галактозидтрансацилаза 286
 ГДФ 24
 Гемоглобин 283
 Генетическая информация, перенос 264, 314
 Генетический код 271
 Ген-регулятор 284
 Гены 135
 Гепатома 112, 182, 313
 Гибрид, устойчивый к действию рибонуклеазы 238
 Гибридизации метод 233
 Гидролиз 26, 29, 44, 50, 51
 Гиперхромный эффект 56
 Гипоксантин 168—170
 Гипохромный эффект 55
 Гистидин 286
 Гистоны 138
 Глиоксилевая кислота 167
 Глицин 168, 173
 Глобулин 287
 Глутамин 173
 Глюкоза 157, 216
 Гной 11, 138
 Гольджи зона 128
 Гормон щитовидной железы 239
 Градиентное центрифугирование 41, 42, 76
 Градиент плотности 65, 132
 ГТФ 24, 25
 Гуаназа 322
 Гуанин 11, 65
 Г — Ц-пары 204
- Двойное лучепреломление в потоке 73
 Дезоксиаденозин 22
 Дезоксигуанозин 22
 Дезоксипентоза 13
 — определение 104
 Дезоксирибоза 11, 13, 20
 Дезоксирибонуклеаза 88, 89, 122, 321
 — ингибиторы 92
 — микрококков 91
 — РНК-ингибируемая 91
 — стрептококка 90
 Дезоксирибонуклеазная проба 122
 Дезоксирибонуклеотиды 23, 180
 — биосинтез 179
 Дезокситимидин 22
 Дезоксиуридинтрифосфат (УТФ) 204
 Дезоксицитидилатдеаминаза 179, 185
 Дезоксицитидин 22
 Денатурация ДНК 75, 76
 6-диазо-5-оксонорлейцин (ДОН) 176
 Дигидрооротовая кислота 178
 Дигидроуридин-5'-фосфат 179
 Дифениламин 104
 Дифосфоэстераза 78, 84, 92
 Дифференциальное центрифугирование 289
 Ди(2-хлорэтил)-сульфид 219
 5,6-дихлор-1-β-D-рибофуранозил-бензимидазол 240
 Диэстераза змеиного яда 210, 211
 — селезенки 205
 ДНК, биологическая функция 299
 — биосинтез 194, 198
 — выделение и очистка 63
 — генетическая функция 314
 — затравочная активность 202
 — клеточного ядра 305
 — кольцевая 72
 — конфигурация молекулы 68
 — метаболическая стабильность 312
 — молекулярные свойства 75
 — молекулярный вес 74
 — одноцепочечная 72, 200, 214
 — — репликативная форма 72, 160
 — плотность 65, 76, 77
 — полярность цепей 206
 — репликация 197
 — синтез 182—184, 215
 — температура плавления 75
 — «тип АТ» 65
 — — ГЦ 65
 — «уродливые» 204
 — физические свойства 73

ДНК, чувствительность к рентгенов-
ским лучам 223

ОДНК 81

ДНК-агар 42, 244, 315

ДНК-аза I 89, 202

— II 91

— зубной железы 91

— микрококков 204

ДНК-нуклеотидилтрансфераза 199

ДНК-полимераза 199, 203, 207

— механизм действия 209

ДНК-содержащие бактериофаги 157,
160

— вирусы животных 155

ДНК-специфические экзонуклеазы
93

ДНК-фосфатаза-экзонуклеаза см.
Экзонуклеаза из *E. coli*

Додецилсульфат натрия 63, 196

Дрожжи 11

ДЭАЭ-сефадекс 43

ДЭАЭ-целлюлоза 34

Желтая мозаика турнепса 152

Зеркальный микроскоп 124

Зобная железа телят 11—13, 200,
208, 212

Зональный электрофорез 34

Импульсная метка 242

ИМФ 170, 171

Ингибиторы рибонуклеазы 88

Инкапсулированные гладкие клетки
300

Инозин 21, 169

Инозиновая кислота (ИМФ) 169, 170

Интерфаза 222, 309

Интерферон 161

5-Иоддезоксигуанидин 223

Ионизирующая радиация, действие
221

Ионофорез 31

Иприт 219

Капсульные агенты 301

Капсулярные признаки 300

Карбамоилфосфат 178

Катаболизм 321

Киназы 181, 185, 186, 215

Клеточное ядро, изолирование 136

Клеточный сок 131, 134

Код 277

— вырожденный 274

— неоднозначность 282

Кодирующая единица 272

Кодирующий участок 268

Кодон 271

Кожа 88

Колифаги 157

Коллинеарность 277

Кольцевая пятнистость табака 152

Комплементарная РНК см. Инфор-
мационная РНК

Константа седиментации 42

Концевой (терминальный) фермент
211

Концевые группы нуклеотидов 49,
50

Копирование ДНК 236

Корнберга фермент 198

Кортизол 239

Коферменты 25

Коэффициент атомной экстинкции 35

Кроличья папиллома Шопа 155

Ксантиловая кислота 176

Ксантин 18

Ксантиноксидаза 322

Ксантозин-5'-фосфат 176

Кустистая карликовость томата 152

Лактатдегидрогеназа 73

Леворфанола 220, 240

Лейкозные клетки 176, 312

Лекарства, устойчивость 301

Лигаза 267

Лизосомы 132

Лучепреломление в потоке 73

Макрофаги 292

Маннит 303

Матричная РНК см. РНК инфор-
мационная

Межнуклеотидные связи 46, 67

6-Меркаптопурин 177, 218

Метагоны 316

Метилди(2-хлорэтил)амин 219

Метилирование 236

Метилированные основания 18, 44,
267

Метилированный альбумин 34, 41,
63, 79, 237

Метиловый зеленый 120—122

5-Метилцитозин 16

Микроскоп кварцевый 119

Микросомы 130, 131, 265

Микроспектрофотометрия 124
 — определение ДНК 120
 Микроэлектрофорез 235
 Минорные основания 18, 44, 57
 Митотический цикл 222, 309
 Митотическое деление 135, 309
 Митохондрия 126, 132
 — кристы 126
 Молекулярная болезнь 283
 «Молекулярное плавление» 56
 Молекулярный вес ДНК 74
 — — РНК 42, 54, 204, 243
 Молярные соотношения оснований 43, 44, 64
 Мононуклеотиды, биосинтез 166
 Морфин 220, 240
 Мочевая кислота 18, 166, 168, 323
 Мочевина 167
 Муравьиная кислота 167
 Мутагены 217, 271
 Мутации 217, 271

Неконцевое включение 210, 229
 Некроз табака 152
 Нервная ткань 112
 Нитроцеллюлозная мембрана 64
 Нитроцеллюлозные фильтры 234
 Нуклеазы 84
 Нуклеин 11
 Нуклеиновые кислоты, определение 99
 — — содержание в тканях 104—108
 Нуклеогистоны 139
 Нуклеозидтрифосфаты, образование 181
 Нуклеозидфосфорилазы 177
 Нуклеозиды 21
 Нуклеопротамины 139
 Нуклеопротейиды клеточного ядра 140
 Нуклеотидпирофосфорилаза 177
 Нуклеотиды, выпадение, гипотеза 188
 — концевое и неконцевое включение 210, 229, 251
 — последовательность 52, 79
 — регуляция биосинтеза 182
 — синтез 177

Облучение 223
 Обмен веществ в печени 288
 Обратная связь, механизм 183
 Огура и Розен метод 102
 Огуречная мозаика 152
 Оксиацетилендиуретинкарбоновая кислота 323

Оксиметилтетрагидрофолевая кислота 180
 5-Оксиметилцитозин 16, 65
 Олигонуклеотиды 41, 86, 90
 Олигорибонуклеотиды 235
 Оператор 284
 — репликации 197, 284
 Оперон 197, 284
 Оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза 218
 Оротовая кислота 178
 Орциновый метод 103
 Основания, пары 69
 Основные краски 120
 Осповакцина 155
 Отрицательная обратная связь 183

Память 290
 Панкреатическая дезоксирибонуклеаза 89, 90
 — рибонуклеаза 84
 Пенициллин 302
 Пентоза 11, 12
 — определение 102, 103
 Пептиды, синтез 270
 Печень 108
 — обмен веществ 288
 — регенерирующая 112, 182, 313
 Пиримидиновые основания, аналоги 217
 Пиримидины 16, 183
 — биосинтез 178
 — катаболизм 325
 — определение 104
 Пиронин 120
 Планарии 291
 Пневмококки 299, 302
 Поглощение в ультрафиолете 34, 104
 Поджелудочная железа 12, 84, 90
 Поли-А 55, 235, 240, 253, 256, 273
 Поли-(А, Г, У, Ц) 255
 Поли-д(А — Т) 231
 Поли-дТ 231
 Поли-(А, У) 55, 253, 255
 Поли-И 253
 Поли-У 55, 240, 253, 256, 273, 281
 Поли-Ц 240, 253, 273
 Полилизин 273, 279
 Полимераза млекопитающих 201
 Полинуклеотидфосфорилаза 58, 88, 243, 248, 252, 256, 275
 Полинуклеотиды, схематическое обозначение 48
 — хроматография 34

- Полиома, вирус 72, 196
 Полиплоидия 109, 308
 Полирибосомы 280
 Полисомы 133, 243, 280
 Полифенилаланин 273
 Полицистронная молекула 285
 Протамин 11, 137, 138
 Противоточного распределения метод 34, 42, 64
 Протопласт 129
 Профлавин 220, 235, 271
 Псевдоуридин 22, 59, 267
 Псевдоуридинмонофосфат 235
 Пситтакоз 155
 Пуриновые основания, аналоги 217
 Пурины 17
 — биосинтез 166
 — катаболизм 321
 — определение 104
 — синтез нуклеотидов 177
 Путомицин 270
 Пуффы 235, 277
- Радиоавтографические исследования 74, 181, 235, 310
 Рак 177, 217, 220
 — хемотерапия 218
 Рассеяние света 74
 Растворимая РНК 22, 39, 41, 42, 52, 54, 57, 134, 240, 251, 267
 — биосинтез 240
 Регенерирующая печень крысы 112, 182, 185, 200, 222, 313
 Рекомбинация цепей 76
 Рентгеновские лучи, действие 221
 Рентгеноструктурный анализ 55, 56, 68
 Репликатор 197
 «Репликационный» фермент 211
 Репликация 194, 264, 315
 — ДНК, механизм 209
 Репликон 197
 Репрессор 284, 285, 286
 Ретикулоциты 244, 280
 Рибоза 11, 18
 Рибозилурацил 22, 57
 Рибонуклеаза 51, 52, 84, 120
 — ингибиторы 88
 — T_1 53, 88
 Рибонуклеазная проба 120
 Рибонуклеотиды 23
 Рибополинуклеотиды, химический синтез 59, 81
 Рибосомная рибонуклеаза 88
 — РНК (г-РНК) 39, 54, 56, 134, 280
- Рибосомная РНК, биосинтез 239
 Рибосомы 39, 40, 54, 126, 129, 133, 239, 241, 243, 265, 277
 Риботимидин 22
 Риботимидинфосфат 235
 РНК бактериофага 160, 248
 — биологическая функция 264
 — биосинтез 229
 — — ДНК-зависимый 230
 — быстросетящаяся фракция 244
 — вируса 59
 — вторичная структура 55
 — выделение 39
 — ДНК-зависимый синтез 230
 — и белковый синтез 264
 — инфекционная 291
 — информационная (*m*-РНК) 39, 141, 234, 240, 246, 271, 280
 — — в клетках животных 244
 — комплекс с фагом T2 234
 — комплементарная форма 39, 240
 — концентрация белкового азота и фосфора 110
 — молекулярный вес 42, 54, 204, 243
 — очистка 41
 — растворимая см. Растворимая РНК
 — репликативная (двухцепочечная) форма 249—251
 — РНК-зависимый биосинтез 246
 — сдвиги в метаболизме 288
 — содержание при беременности 111
 Д-РНК см. РНК информационная
m-РНК см. РНК информационная
s-РНК см. РНК растворимая
 РНК-переносчик см. РНК растворимая
 РНК-полимераза ДНК-зависимая 234, 235, 240
 — РНК-зависимая 246, 248
 РНК-посредник см. РНК информационная
 РНК-репликаза 248
 РНК-содержащие вирусы животных 155
- Саркома Иенсена 221
 Саркомия 220
 Секреторные гранулы 126
 Серповидноклеточная анемия 283
 Сополимер д(А — Т) 212, 235
 — (дГ)/(дЦ) 214, 235
 Спектрофотометрия 307, 308

- Стрептодорназа 90
 Стрептолизин S 254, 291
 Стрептомицин 301—303
 Стрептонигрин 220
 Сферические вирусы растений 154
 Съёмных плёнок метод 310
- Такадиастаза 88
 Талассемия 283
 Терминальный (концевой) фермент 211
 Террамицин 270
 Тетрагидрофолевая кислота (ТГФ) 171, 172
 Тетрануклеотидная гипотеза 44
 Тетраплоидные ядра 308
 Тимидилатсинтетаза 180
 Тимидин 22, 181, 197, 198, 311
 Тимидинкиназа 186
 Тимидинмонофосфат (ТМФ) 180, 185, 186
 Тимидинполинуклеотиды 235
 Тимидинтрифосфат (ТТФ) 181, 184, 198
 Тимин 16, 65
 — биосинтез производных 180
 Тиминнуклеотид 180
 Тимонуклеиновая кислота 13
 Тиогалактозидтрансацилаза 286
 Тиоредоксин 179
 Титрование электрометрическое 68
 Толуидиновый синий 120, 121
 Тофи 324
 Трансдукция 304
 Транскрибирующая РНК см. РНК информационная
 Транскриптаза 234
 Транскрипция 264, 315
 Трансляционная РНК см. РНК информационная
 Трансляция 264, 277
 Транспортная РНК см. РНК растворимая
 Трансформация 304, 305
 Трансформирующие факторы 299
 Триплеты 273—275
 Триптофансинтетаза 277, 315
 Тритиконуклеиновая кислота 12
 1,1,3-трициано-2-амино-1-пропен 291
 ТТФ см. Тимидинтрифосфат
- УДФ 24
 Ультразвуком обработка 202
- Ультрафиолетовая микроскопия 118
 — цитофотометрия 124
 Ультрафиолетовые лучи, действие 223
 УМФ 179
 дУМФ 179, 185
 Унна — Паппенгейма краситель 120
 Уотсона — Крика модель 69—71, 206
 Урацил 16
 Уриказа 323
 Уреидосукцинат 178, 183
 Уридиловая кислота 23
 Уридин 21, 235
 Уридинмонофосфаты 23
 «Уродливые» ДНК 204
 Устойчивость к лекарствам 301
 УТФ 24, 179
- Фаг(и) серии T 157
 — f2 161, 249
 — MS2 161, 249
 — α 160, 239
 — S13 160
 — SP8 160
 — ϕ R 160
 — λ 160
 Фенилаланин 281
 Фенол 40, 63
 pH5 фермент (pH5-осадок) 40, 134, 267
 Фельгена реакция 117, 143
 Фибробласты 186, 222
 Флуорохромные красители 120
 Фолевая кислота 171, 180
 Формальдегид 72
 Формиат 170, 172, 180
 Формилглицинамидрибонуклеотид (формил-ГАР) 170—173
 α -формилглицинамидинрибонуклеотид (формил-ГАМ) 170, 173, 174
 Фосфодиэстераза 72, 93
 — змеиного яда 50, 58, 92
 — селезенки 92
 Фосфомоноэстераза 51, 72, 96
 Фосфорибозиламиноимидазол-карбоксилаза 175
 5-Фосфорибозилпирофосфат (ФРПФ) 173, 177
 Фосфорная кислота 11
 Фосфоролиз 256
 Фосфор фосфоропротеидов 100
 Фтордезоксидиридин 223
 5-Фторурацил 218, 249
 5-фторуридинмонофосфат 235
 Фурфурол 102, 103

- Хемотерапия 218
Хлорамфеникол 270
Хлоропласты 134, 316
Хроматин 135, 287
Хроматография 29, 44
— в тонком слое 33
— на бумаге 30
— — колонках 32, 34, 41, 42, 63, 234, 244, 315
— полинуклеотидов 34
Хромосомы 74, 75, 135, 142, 235, 277, 305, 308
- Цветные реакции 102
ЦДФ 24, 179
дЦДФ 179
Целестиновый голубой 122
Ценкера реактив 121
Центриоль 128
Центрифугирование в градиенте плотности 65, 160, 196, 237, 241, 245
— дифференциальное 130
Центросома 128
Циклические нуклеотиды, номенклатура 49
— 2',3'-фосфаты 47, 86, 88
Цистеин 268
Цистроны 283
Цитидиловая кислота 23
Цитидин 21
Цитидинмонофосфат 23
Цитозин 11, 16, 65, 179
Цитоплазма 125
Цитоплазматическая ДНК 134
— наследственность 316
Цитофотометрия количественная 123
Цитохимия 125
дЦМФ 179
- ЦТФ 24, 25, 179
Четыреххлористый углерод 111
- Щелочной гидролиз 26, 51
Шмидта — Танигаузера метод 101
Шнейдера метод 100
- Эволюционная теория 305
Экдизон 239, 277
Экзонуклеаза 84, 92, 199, 201
— из *E. coli* 93—95
Эктеола-целлюлоза 34
Электронная микроскопия 74, 126, 127, 142
Электрофорез зональный 34
— на бумаге 205
— — крахмальном геле 34
Эмбриональная индукция 292
Эндонуклеаза 84
Эндоплазматическая сеть 126, 127, 289
Эписома 197
Эргастоплазма 127
Эргосома 280
Эритематозная волчанка 310
Эритроциты 283
Эстрадиол 239
Эстроген 292
Эухроматин 135
Эффекторы 285, 286
- Ядерная мембрана 134
— РНК 141
Ядро 125, 134, 137, 287
— Дейтерса 291
— изолирование 136
Ядрышко 135, 142

О Г Л А В Л Е Н И Е

Предисловие к русскому изданию	5
Предисловие к английскому изданию	6
Из предисловия автора	7
Принятые сокращения	9
Глава I. Введение	11
Литература	14
Глава II. Продукты гидролиза нуклеиновых кислот	16
Литература	26
Глава III. Хроматография и поглощение ультрафиолетовых лучей	29
Литература	36
Глава IV. Выделение, строение и свойства РНК	39
Литература	60
Глава V. Получение, строение и свойства ДНК	63
Литература	81
Глава VI. Нуклеазы и родственные им ферменты	84
Литература	97
Глава VII. Химические методы определения нуклеиновых кислот	99
Литература	114
Глава VIII. Гистохимия и цитохимия	117
Литература	144
Глава IX. Нуклеиновые кислоты вирусов	151
Литература	162
Глава X. Биосинтез мононуклеотидов	166
Литература	188
Глава XI. Репликация и биосинтез ДНК	194
Литература	223
Глава XII. Биосинтез РНК	229
Литература	257
Глава XIII. Биологическая функция РНК	292
Литература	292
Глава XIV. Биологическая функция ДНК	299
Литература	316
Глава XV. Катаболизм нуклеиновых кислот	321
Литература	326
Предметный указатель	327

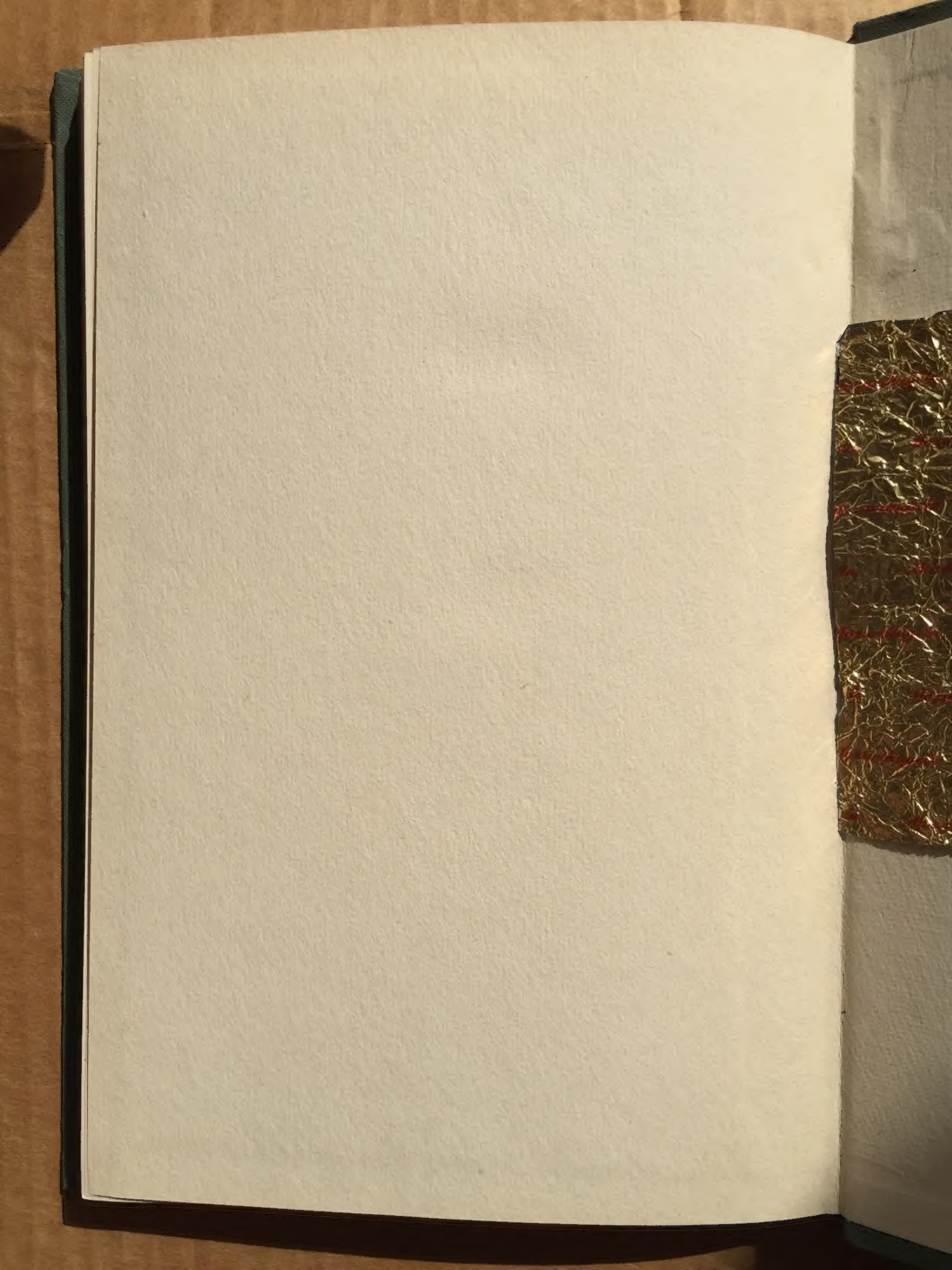
Дж. Дэвидсон
БИОХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Редактор Л. Г. Тер-Саркисян
Художник В. В. Евдокимов
Художественный редактор Ю. Л. Максимов
Технический редактор А. Д. Хомяков

Сдано в производство 29/IX 1967 г.
Подписано к печати 22/I 1968 г.
Бумага тип. № 1 60 × 90¹/₁₆ = 10,5 бум. л. 21 печ. л.
Уч.-изд. л. 22,15. Изд. № 4/3898
Темплан изд. «Мир» 1967 д. пор. № 124
Цена 1 р. 77 к. Зак. 1281

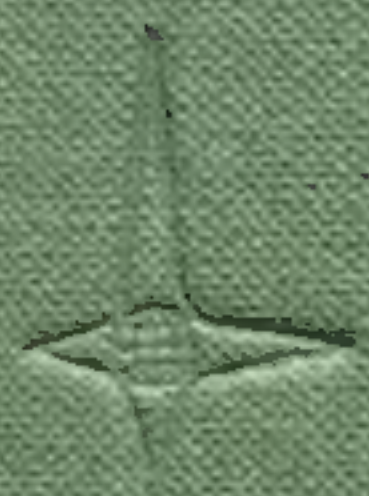
ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
Москва, 1-й Рижский пер., 2

Московская типография № 16
Главполиграфпрома
Комитета по печати
при Совете Министров СССР
Москва, Трехпрудный пер., 9





13.77x.



ON THE FRONT OF THE